

**Evaluierung des Einflusses von Stressproteinen auf das
frühe Überleben sowie die Funktion transplanterter
Inselzellen des Schweins und Menschen im
Kleintiermodell**

INAUGURAL-DISSERTATION zur Erlangung des Grades
eines Doktors der Medizin des Fachbereichs Medizin der
Justus-Liebig-Universität Gießen

Eingereicht von
Adel Maataoui
aus Braunschweig
Giessen, 2005

Aus der Medizinischen Klinik III und Poliklinik
des Medizinischen Zentrums für Innere Medizin
der Justus-Liebig-Universität Giessen

Direktor: Professor Dr. med. R.G. Bretzel

Gutachter: Professor Dr. med. Bretzel

Gutachter: PD Dr. med. Weißmann

Tag der Disputation: 13.02.2006

„Ich erkläre: Ich habe die vorgelegte Dissertation selbstständig, ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt, die ich in der Dissertation angegeben habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nicht veröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten.“

Meinen geliebten Eltern

INHALTSVERZEICHNIS

1. Einleitung	8
2. Material und Methoden	22
2.1 Materialien	22
2.1.1 Reagenzien	22
2.1.2 Antikörper	22
2.1.3 Narkotika	23
2.1.4 Lösungen und Puffer	23
2.2 Methoden	26
2.2.1 Isolierung Langerhansscher Inselzellen aus humanen und porzinen Pankreata	26
2.2.2 Versuchstiere	27
2.2.3 Hyperthermische Vorbehandlung	28
2.2.4 Ac-DEVD-Chloromethyl Ketone Vorbehandlung der Inselzellen	29
2.2.5 Diabetesinduktion bei der Maus	29
2.2.6 Transplantation	30
2.2.6.1 Vorbereitung des Transplantates	30
2.2.6.2 OP-Vorbereitung des Rezipienten	30
2.2.6.3 OP Durchführung	30
2.2.6.4 Nephrektomie	32
2.2.6.5 Insulinextraktion	32
2.2.7 Western Blot Analyse	32

2.2.8 Statistische Datenanalyse	35
3. Ergebnisse	36
3.1 Versuchsablauf	36
3.2 Auswirkung von moderater und starker Hyperthermie auf die Proteinexpression isolierter Inselzellen	36
3.2.1 Auswirkung von moderatem und starkem Stress auf die Expression von Hitzeschockproteinen	36
3.2.2 Auswirkung von moderater und starker Hyperthermie auf die Expression pro- bzw. antiapoptotischer Proteine	38
3.3 Einfluss einer hyperthermischen Inselkonditionierung auf die Insulinwiedergewinnung nach Transplantation in nichtdiabetische Mäuse	45
3.4 Einfluss einer hyperthermen Inselvorbehandlung auf die Transplantatfunktion in diabetischen C57/Bl6j Mäusen	48
3.5 Einfluss von DEVD-CMK auf Funktion und Wiedergewinnung von transplantierten Inselzellen	49
3.5.1 Insulinextraktion nach Transplantation in nichtdiabetische C57/Bl6j Mäuse	49
3.5.2 Funktion non vorbehandelten prozinen Inselzellen nach Transplantation in diabetische C57/Bl6j Mäuse	54

4. Diskussion	57
4.1 Auswirkungen moderater und starker Hyperthermie auf die Proteinexpression isolierter Inselzellen	59
4.2 Einfluss hyperthermer Vorbehandlung auf die Insulinwiederfindung nach Inselzelltransplantation in nichtdiabetische und diabetische Mäuse	64
4.3 Auswirkungen von DEVD-CMK auf das Überleben und die in vivo Funktion transplanterter Schweineinseln	70
5. Zusammenfassung	73
6. Summary	75
7. Literaturverzeichnis	77
8. Anhang	91
8.1 Abkürzungen	91
8.2 Tabellen	93
8.3 Abbildungen	93
9. Lebenslauf	98
10. Danksagung	101

1. Einleitung

Die Zivilisationskrankheit Diabetes mellitus ist heute mit einer Prävalenz von ca. 5% [1] in Deutschland vertreten. Die beiden häufigsten, pathogenetisch unterschiedlichen Formen sind der insulinabhängige Typ 1 (Insulin Dependant Diabetes Mellitus: IDDM) und der insulinunabhängige Typ 2 (Non Insulin Dependant Diabetes Mellitus: NIDDM) Diabetes mellitus.

Auf andere seltene Diabetesformen, wie beispielsweise den Gestationsdiabetes, soll in dieser Arbeit nicht näher eingegangen werden.

Gekennzeichnet sind beide Formen des Diabetes mellitus durch das Unvermögen des Organismus die Homöostase des Glucosehaushaltes zu gewährleisten. Dabei greifen zwei völlig unterschiedliche Pathomechanismen, die beide letztendlich in der Dysregulation enden.

Der Typ 2 Diabetes nimmt ca. 95% der Diabetikerprävalenz für sich in Anspruch, was bedeutet, dass 5,7 Millionen Menschen in Deutschland an dieser Erkrankung leiden [1].

Pathophysiologisch spielt beim NIDDM meist eine genetische Disposition in Kombination mit einer peripheren Insulinresistenz die Hauptrolle. Diese Resistenz wird im Allgemeinen durch ein extremes Übergewicht der Betroffenen

verursacht. Der Organismus versucht die Insulinresistenz durch eine Hypersekretion von Insulin auszugleichen, mit der Folge einer weiteren Gewichtszunahme, welche die periphere Insulinresistenz weiter fördert. Wenn im Laufe der Zeit diese Hypersekretion nicht mehr aufrechterhalten werden kann, steigt der Blutzucker und der Diabetes wird manifest.

Therapeutisch stehen beim NIDDM zunächst konservative Maßnahmen im Vordergrund. Primär ist hier die Gewichtsreduktion zu nennen. Aber auch Sport sowie spezielle Diäten führen häufig schon zu einer akzeptablen Blutzuckereinstellung.

Nach Ausschöpfen dieser Möglichkeiten kann mit oralen Antidiabetika, und in fortgeschrittenen Fällen auch mit Insulin versucht werden die Stoffwechselsituation in den Griff zu bekommen.

Der Typ 1 Diabetes mellitus, meist im Jugendalter beginnend, nimmt momentan ca. 5% der Diabetesprävalenz für sich in Anspruch. In Zahlen bedeutet dies, dass ungefähr 300.000 Menschen in der Bundesrepublik Deutschland an der juvenilen Form des Diabetes leiden [1].

Zu Beginn der Erkrankung steht eine unspezifische Autoimmuninsulinitis, die durch eine progrediente Zerstörung der insulinproduzierenden Beta-Zellen gekennzeichnet ist.

Dabei besitzen genetische Faktoren eine prädisponierende Funktion:

20% der Typ 1 Diabetiker weisen eine positive Familienanamnese auf und 90% der Betroffenen besitzen die HLA-Merkmale DR 3 und/oder DR 4. Für eine akute Autoimmuninsulinitis sprechen beim frisch manifestierten Typ 1 Diabetes folgende Befunde:

- Infiltration der Inselzellen mit autoreaktiven T-Lymphozyten.
- Remission unter immunsuppressiver Therapie.
- Nachweis von Inselzell-Autoantikörpern (ICA = islet cell autoantibodies) in über 75% der Fälle, die aufgrund verschiedener Zielantigene in verschiedene Autoantikörper differenziert werden können:
 1. Insulinautoantikörper (IAA)
 2. Antikörper gegen Glutamat-Decarboxylase der Beta-Zelle (GADA)
 3. Antikörper gegen Tyrosinphosphatase IA-2 (IA-2A).

Sind im Alter von zwei Jahren bereits zwei oder alle drei Inselautoantikörper vorhanden, so ist mit einer sicheren Diabetesmanifestation vor dem 10. Lebensjahr zu rechnen.

Im weiteren Verlauf ist der juvenile Typ des Diabetes mellitus durch einen absoluten Insulinmangel gekennzeichnet, der eine Substitution von Insulin zur Regulation des Blutzuckerhaushaltes erfordert.

Mit der Entdeckung des Insulins im Jahre 1922 durch Banting und Best [2] sind in der Behandlung des insulinabhängigen Diabetes mellitus große Fortschritte gemacht worden. Bis zu diesem Zeitpunkt war die hyperglykämische Entgleisung, das diabetische Koma, die praktisch unabwendbare Todesursache für die meisten der Typ 1 Diabetiker (juveniler Tod). Seit dem Beginn der Insulinära wird der juvenile Tod des Diabetikers in den Industrieländern nur noch selten beobachtet.

Die Schemata für die Insulintherapie sind seit der Entdeckung des Insulins immer weiter verfeinert worden. Heute kommen im Wesentlichen zwei verschiedene Therapieansätze zur Anwendung:

1. Das konventionelle Therapieschema:

Dieses Schema sieht einen starren Applikationsplan vor, bei dem sich der Patient zu festgelegten Zeiten definierte Einheiten Insulin injizieren muss. Durch einen starren Speiseplan ist der Patient gezwungen feste Abstände zwischen Insulininjektion und Mahlzeit einzuhalten, um nicht in eine Stoffwechselentgleisung zu geraten.

Bei diesem Schema kommt es häufig zu Komplikationen, die meist durch einfache Fehler in der Anwendung ausgelöst werden. Häufig handelt es sich dabei um eine inadäquate Nahrungsaufnahme, die nicht im richtigen Verhältnis zur injizierten Insulinmenge steht [3].

2. Das intensivierte Therapieschema:

Dieses Schema orientiert sich an der physiologischen Insulinsekretion. Die intensivierte Insulintherapie ist durch das so genannte Basis-Bolus-Prinzip gekennzeichnet, bei dem der Patient seinen Insulinbedarf an die beabsichtigte Nahrungsaufnahme anpasst. Die Lebensqualität steigt für den Patienten, da er seinen Tagesablauf weitgehend individuell gestalten kann.

Das große Problem der intensivierten Insulintherapie besteht in dem Risiko schwerer Hypoglykämien, die aufgrund der normnahen Therapie bei dieser Patientengruppe immer wieder beobachtet werden und nicht selten einen letalen Ausgang finden. Die Untersuchungen gehen von einer Verdreifachung der schweren Hypoglykämien seit Einführung der intensivierten Insulintherapie aus [3].

Beide Schemata verlangen vom Patienten größte Anstrengungen und Compliance, um den maximalen Erfolg, d.h. eine optimale Blutzuckereinstellung, zu gewährleisten.

Trotz der Möglichkeiten, die die aktuelle Diabetestherapie bietet, sind die Langzeitergebnisse nicht zufriedenstellend. Auch wenn durch moderne Methoden, wie die intensivierte Insulintherapie, akute Stoffwechseldekompensationen wie das ketoazidotische Koma weitgehend ausgeschaltet werden konnten, sind die Probleme heute anders gelagert:

Lebenserwartung und Lebensqualität des Diabetikers werden heute zum größten Teil durch die Entwicklung sowie den Verlauf von Spätkomplikationen an Herz- und Gefäßsystem, Augen, Nieren und Nervensystem bestimmt [4].

Ätiologie dieser Sekundärerkrankungen sind im Wesentlichen die diabetische Mikroangiopathie, die sich vor allem an Augen, Nerven und Nieren manifestiert, sowie die diabetische Makroangiopathie in Form einer Arteriosklerose. Dabei muss auch im Zeitalter der intensivierten Insulintherapie mit dem Auftreten einer Nierenfunktionsstörung bei ca. 50% der Diabetiker nach fünfundzwanzigjähriger Krankheitsdauer gerechnet werden [5]. In den Industrieländern repräsentiert die diabetische Nephropathie damit die Hauptursache der terminalen, dialysepflichtigen Niereninsuffizienz.

Ziel der Therapie muss es deshalb sein, die Blutzuckereinstellung soweit zu optimieren, um Spätschäden am Organismus des Diabetikers zu verhindern. Zu diesem Zweck stehen unterschiedliche Verfahren zur Verfügung, die

entweder etabliert sind, oder sich noch in klinischen Entwicklungsphasen befinden.

Der biologische Ersatz des erkrankten Inselzellapparates durch die Pankreasorgan- und Inselzelltransplantation ist ein Therapieverfahren mit dem sich, unabhängig von Insulininjektionen, eine signifikante Verbesserung, im Idealfall eine Normalisierung des glykolisierten Hämoglobins als Langzeitparameter einer korrekten Blutzuckereinstellung erreichen lässt [6, 7].

Bis zum heutigen Zeitpunkt ist die Transplantation des Pankreas oder des isolierten Inselzellanteils Typ 1 Diabetikern vorbehalten, die an chronischer Niereninsuffizienz leiden und nach langer Dialysebehandlung auf eine Nierentransplantation warten, bzw. bereits nierentransplantiert sind und somit ohnehin immunsuppressiv behandelt werden müssen. Weiterhin können auch Diabetiker von einer solchen Transplantation profitieren, die mittels konventioneller oder intensivierter Insulintherapie nur inädaquat einstellbar waren und unter rezidivierenden hypoglykämischen Episoden litten [8].

Erstmals 1966 in Minneapolis durchgeführt [9] gilt die Pankreas-Transplantation heute als ein Verfahren, das in den letzten Jahren mit Ein-Jahres-Funktionsraten von bis zu 90% gute Erfolge zeigte [10]. Die so behandelten Diabetiker

können demnach zum größten Teil auf jegliche Insulininjektionen nach Implantation des Organs verzichten [11]. Weiterhin lässt sich möglicherweise sowohl die sensible [12] als auch die autonome [13] Neuropathie klinisch positiv beeinflussen, die Progredienz einer diabetischen Nephropathie kann gehemmt werden [14]. Histologisch nachweisbare diabetische renale Läsionen scheinen nach fünf bis zehn Jahren reversibel [15] und auch mit einer Progredienz der diabetischen Retinopathie ist vier Jahre nach Transplantation nicht mehr zu rechnen.

Somit ist in Kombination mit einer Nierentransplantation mit einer signifikanten Verbesserung von Lebensqualität [16] und Lebenserwartung [17-22] zu rechnen.

Den Vorteilen dieses technisch aufwendigen Eingriffs unter Vollnarkose stehen in Abhängigkeit von der Drainagetechnik der exokrinen Pankreasenzyme folgende Komplikationen gegenüber:

Bei Patienten mit Drainage der exokrinen Pankreasenzyme in die Blase können rezidivierende Harnwegsinfekte bis hin zur Urosepsis schwere Komplikationen darstellen. Diese können bei bis zu 30% der Patienten eine operative Umwandlung der Blasendrainage in eine enterale Drainage notwendig machen. Die enterale Drainage ist dagegen mit dem häufigen Auftreten technischer Komplikationen verbunden. Zudem verzichtet man

hierbei auf ein Monitoring des Transplantatüberlebens durch die Analyse der Urinamylase und –lipase.

Aber auch Komplikationen wie eine schwere Pankreatitis mit all ihren Folgeerkrankungen [23] lassen nach anderen, schonenderen Möglichkeiten der Therapie suchen.

Hier ist die Übertragung des isolierten endokrinen Anteils des Pankreas, der Langerhanschen Inselzellen, eine Alternative, die sich im Vergleich zur Gesamtorgantransplantation durch wesentliche Vorteile auszeichnet:

- Die einfache und schnell durchführbare Transplantation:
Die isolierte Inselmasse wird, unter lokaler Betäubung, über einen Katheter in der Vena portae in die Leber eingeschwemmt, wo sich die Inselzellen ansiedeln und ihre Funktion aufnehmen.

- Die Möglichkeit durch immunmodulatorische Maßnahmen die Immunogenität und Antigenität der Inselzellen vor Transplantation zu verringern, um so die Dosis der applizierten Immunsuppressiva zu reduzieren [24].

Neuere Studien konnten zeigen, dass die Transplantation einer ausreichenden Masse von Inselzellen unter Anwendung von Sirolimus, Tacrolimus und Daclizumab, bei gleichzeitiger Vermeidung inseltoxischer Steroide in 100% der Fälle zu einer Insulinunabhängigkeit bei den Patienten führt [25].

Hierbei stellt eine ausreichend große Inselmasse, welche aus bis zu drei oder mehr Spenderorganen isoliert werden muss, eine kritische Größe für den Transplantationserfolg dar [26].

Neben zahlreichen Spenderfaktoren wie Hirntod [27], Organentnahmetechnik [28, 29] und Sauerstoffminderversorgung der Inselzellen sowohl vor [29] als auch nach Transplantation [30], sind es vor allem multiple Stresssituationen, die es aufgrund apoptotischer und inflammatorischer Mechanismen erfordern, dass teilweise drei oder mehr Spenderorgane zur Heilung des Patienten benötigt werden [26].

Stress wirkt auf das Inselgewebe vor allem über den Isolierungsprozess und nach intraportaler Transplantation ein:

1. Es konnte gezeigt werden, dass die Verwendung von endotoxinhaltigen Reagenzien während der Inselisolierung, wie z.B. Kollagenasen, Serum und Ficoll zu einer Aktivierung von proinflammatorischen

Cytokinen in den Inselzellen führt [31-34]. Das Fehlen der Inselmatrix nach Inselzellisolation scheint dabei eine wesentliche Rolle zu spielen. Die Einleitung des programmierten Zelltodes, der Apoptose, konnte in isolierten Inselzellen während deren Kultivierung bewiesen werden [35]. Dabei nahm die Zahl apoptotischer Prozesse mit der Dauer der Kultivierung zu.

2. Die Expression von Gewebefaktoren auf den transplantierten Inselzellen induziert eine Aktivierung der Gerinnungskaskade sowie des Komplementsystems (Instant Blood-Mediated Inflammatory Reaction; IBMIR) nach erfolgtem Blutkontakt. Die folgende Adhäsion von Thrombozyten sowie die Einwanderung von Leukozyten in die Inselzellen führen dann zur frühen Dysfunktion. Goto et al berichteten über einen protektiven Effekt von niedermolekularem Dextransulfat, welches sowohl in vitro als auch im Kleintiermodell die Leukozyteninfiltration signifikant hemmen konnte. Im Tiermodell konnte so eine signifikant längere Funktion der Inselzellen, nach Vorbehandlung der Empfänger mittels niedermolekularem Dextransulfat, erreicht werden [36, 37].
3. Unspezifische inflammatorische Reaktionen, die sofort nach Transplantation zu einem hohen Verlust bzw. zur Fehlfunktion der Inselzellen führen [38]. Das Transplantat ist sofort nach intraportaler Transplantation den

unspezifischen inflammatorischen Reaktionen vor Ort ausgesetzt. Ortsansässige Makrophagen, Hepatozyten und endotheliale Zellen führen durch die Produktion von Cytokinen (IL-1 β , IFN γ , TNF α) und Stickoxid (NO) zu einer Dys- bzw. Fehlfunktion der transplantierten Inselzellen, die im Makrophagen-depletierten Tiermodell verhindert werden kann [38-40]. Bottino et al. konnten zeigen, dass durch Inhibition der Kupffer Zellen ein signifikant längeres Überleben der transplantierten Inselzellen zu erreichen ist [39].

Diese lokale Inflammation und unmittelbar ablaufende Blutreaktion, die sowohl eine Komplementreaktion als auch eine Gerinnungsreaktion beinhaltet, scheint durch eine Immunsuppression nicht zu unterdrücken zu sein. Immunsupprimierte bzw. T-Zell depletierte Empfänger zeigen ebenfalls frühe, unspezifische inflammatorische Reaktionen, die zu Dys- bzw. Fehlfunktionen führen [38, 41, 42].

Zellen, die solchen oder anderen Stresssituationen ausgesetzt sind, begegnen diesen mit der Synthese von Stressproteinen (HSPs), die ihnen ein Überleben in einer feindlichen bzw. tödlichen Umgebung ermöglichen [43]. Nach hitzeinduzierter Synthese von Hitzeschockproteinen zeigen Inselzellen von Ratten und Schweinen in vitro eine signifikant höhere Resistenz gegenüber Stickoxid (NO) und Sauerstoffradikalen [44, 45] [46, 47]. Diese Beobachtung wird im Wesentlichen auf

den Schutz gegen einen intrazellulären Energieverlust zurückgeführt [48, 49].

Gleichzeitig können dieselben Stresssituationen zu einer vermehrten Expression von proapoptotischen Proteinen führen. So konnte im Tierversuch gezeigt werden, dass die Induktion von Hitzeschockproteinen zu einer geringeren Wiedergewinnung initial transplantierten Insulins im Vergleich zu einer unbehandelten Vergleichsgruppe führt. Als Gründe dafür werden einerseits eine vermehrte Apoptoserate der Inselzellen, andererseits eine größere Immunogenität der Inselzellen nach Synthese von Hitzeschockproteinen postuliert [46, 47].

Dies bedeutet, dass sowohl Verteidigungsstrategien (Synthese von Stressproteinen) als auch die Einleitung des programmierten Zelltodes (Apoptose) von identischen Stresssituationen induziert werden können.

Ziel der vorliegenden Arbeit war die Untersuchung der bis dato wenig verstandenen simultanen Expression von Hitzeschock- und proapoptotischen Proteinen. Um den Einfluss von hitzeinduzierten Stressproteinen und apoptotischen Proteinen auf die Funktion isolierter Inselzellen in vivo aufzuklären, wurden folgende Fragestellungen bearbeitet:

- Unterschiede in der Synthese von Hitzeschockproteinen bzw. pro- und antiapoptotischen Proteinen als Antwort auf unterschiedlich starken Stress in Form von Hyperthermie.
- Einfluss einer hyperthermen Vorbehandlung von Inselzellen des Schweines auf das frühe Überleben sowie die Funktion transplanteder Inselzellen im Kleintiermodell.
- Evaluierung von Überleben und Funktion transplanteder Inselzellen nach Vorbehandlung mit dem Caspasehemmer Ac-DEVD-CMK.

2. Material und Methoden

2.1 Materialien

2.1.1 Reagenzien

- Alkohol 80%, vergällt, Apotheke des Universitätsklinikums Giessen
- Aqua bidest., Pfrimer & Co
- Hank's solution, steril, Gibco Ltd., Scotland
- Isotone Kochsalzlösung, 0,9% NaCl, Pfrimmer & Co
- Kollagenase vom Cl. histiolitikum, lypophilisiert, reinst, 0,77 U/mg,
- Natriumhydrogencarbonat, steril, Braun Melsungen
- Nembutal(r), (Pentobarbital-Natrium, 60 mg/dl)
- Ac-DEVD-Chloromethyl Ketone (CMK)

2.1.2. Antikörper

1. Primärantikörper

- Anti-Human HSP-90 Stressgen Biomol, Hamburg
- Anti-Human HSP-70 ABR Dianova, Hamburg
- Anti Fas and FasL Pharmingen, Heidelberg
- Anti-Human Bax, Bcl-2,
HSP-60, HSP-27, iNOS Stressgen Biomol, Hamburg

- Anti-Human DFF Pharmingen, Heidelberg
- Anti-Human HO-I Santa Cruz, Heidelberg

2. Sekundärantikörper

- Anti- Maus Dako, Hamburg

2.1.3. *Narkotika*

- Äther, A 254 ASID Bonz GmbH
- Metofane® Janssen-Cilag, Neuss
- Narcoren® Rhône, Merieux, Laupheim

2.1.4. *Lösungen und Puffer*

SDS Puffer

- 100 µl Glycerol
- 125 µl Tris Puffer (0,5 M, pH 6,8)
- 200 µl SDS Gel (10%)
- 475 µl Aqua destillata

HBSS (Hank's Gebrauchslösung: Hanks balanced salt solution):

- 10 ml Penicillin-Streptomycin
- 100 ml HBSS (10x)

- ca. 3-5 ml Natriumhydrogencarbonat unter sterilen Bedingungen mit Aqua destillata ad 1L auffüllen

Insulin-Extraktions-Reagenz (Ziegler-Reagenz):

- 76 ml Äthanol (96%)
- 8 ml H_3PO_4 (1M)
- 4 ml Aqua destillata
- Lagerung bei 4°C

IRI-Puffer:

- 4,7g Na_2HPO_4
- 6g NaCl
- 3g Humanalbumin
- 0.2 g NaN_3
- ad 1000 ml Aqua destillata
- Lagerung bei 4°C

Medium 199 (TCM):

- 5% Fetal Calf serum (FCS)
- 10% Porcine Serum
- 2 mM N-acetyl-L-alanyl-L-glutamine
- 20 ml Hepes
- 100 IU/ml Penicillin
- 100 µg/ml-Streptomycin (Biochrom, Berlin)
- 20 µg/ml ciprofloxacin (Bayer, Leverkusen)
- 900 ml Aqua destillata

- 100 ml Medium 199 (10x konz.)
- 0.45 ml NaOH (10 mol/L)

Trinkwasser für Nacktmäuse:

- 1350 mg Kaliumsorbit
- 300 mg Tetrazyclin
- ad 1000 ml steriles Leitungswasser
- mit 6 N HCL (Titrisol R) auf pH 2,5 eingestellt

Herstellung der STZ Lösung:

- STZ Dosierung 190 mg/ kg Körpergewicht (KG)
- Streptozotizin (Upjohn, Heppenheim) in ein 1,5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäß abwiegen
- vor Verbrauch in 1 ml steriler physiologischer NaCl Lösung durch starkes Schütteln lösen

Material:

- Laborwaage, Mettler, Gießen
- Chirurgische Gesichtsmaske, Johnson & Johnson, Nordenstedt
- Einweghandschuhe, Peha-taft, Hartmann, Heidenheim
- Einmalkanülen, steril, 26G, Braun Melsungen
- Einmalspritzen, steril, 1ml, Braun Melsungen
- Eppendorf-Gefäße, Eppendorf, Hamburg
- Präpariertes Blue cap mit Stopfen zur Fixation des Schwanzes

- Zellstoff und Tupfer, Pur Zellin, Hartmann, Hamburg

Weitere verwendete Materialien und Geräte werden im jeweiligen Unterkapitel der Methoden näher erläutert.

2.2 Methoden

2.2.1. Isolierung Langerhansscher Inselzellen aus humanen und porzinen Pankreata

Spender

Als Spenderorgane für die Gewinnung der Langerhansschen Inselzellen wurden humane und porzine Pankreata verwandt.

Die humanen Spenderorgane wurden über Eurotransplant vermittelt. Die Organe wurden nach den von der Justus-Liebig-Universität Gießen vorgegebenen Kriterien von Eurotransplant zugeteilt.

Porzine Spenderorgane stammen ausschließlich von adulten (>2 Jahre) weiblichen Zuchtschweinen, die aufgrund von Fertilitätsstörungen oder anderer körperlicher Gebrechen aus der Zucht ausgeschlossen wurden.

Verfahren der Inselzellisolierung

Humane und porzine Inselzellen wurden wie von Brandhorst et al. [50, 51] beschrieben isoliert.

Die Quantifizierung der isolierten Inselmasse erfolgte durch Berechnung der Inseläquivalenzzahl (IEQ) [52]. Für die Versuche wurden die Inselzellen in Petrischalen aliquotiert.

Die Viabilität wurde *in vitro* durch eine Trypanblau sowie Dithizone Färbung ermittelt.

2.2.2. Versuchstiere

Als Versuchstiere dienten männliche, thymusaplastische NMRI Mäuse (Gewicht 20-25 g, Harlan, Hannover) und männliche, immunkompetente C57/Bl6j Mäuse (Gewicht 20-25g, Harlan, Hannover).

Immunkompetente Mäuse wurden in Standardkäfigen aus Plastik mit oberer Gitterabdeckung mit maximal 10 Tieren pro Käfig untergebracht. Ausgelegt wurden die Käfige mit Sägespäne, wobei die Tiere freien Zugang zu Futter (Altromin, Tierlaborservice, Lage-Lippe) und Wasser hatten.

Die Haltung der thymusaplastischen Nacktmäuse erforderte eine Isolation vom restlichen Tierbestand in einem separaten Raum (Raumtemperatur ca. 23-26°C). Die Käfige wurden durch Luftfilter (Ebeco, Castrop-Rauxel) vor direktem Kontakt mit Raumluft geschützt. Wichtige Maßnahmen zum Schutz der Tiere vor Infektionen, beinhalteten das Autoklavieren des standardisierten Futters, der Sägespäne, jeglicher interio-
rierer

Käfigbestandteile und das spezielle Ansetzen von angesäuertem, antibiotikahaltigem Trinkwasser (2.1.5). Jeder Kontakt mit den Tieren wurde unter weitgehend aseptischen Bedingungen ausgeführt.

2.2.3 Hyperthermische Vorbehandlung

Die frisch isolierten, purifizierten (Reinheitsgrad >90%) Inselzellen wurden während der hyperthermen Behandlung in bicarbonatfreiem Medium 199 inkubiert.

Quantifizierte Aliquots (2000 IEQ) frisch isolierter, gereinigter Inselzellen wurden in Flachbodengläschen (VWR intern., Frankfurt a.M.) mit TCM 199 (1 ml) (2.1.5.) gefüllt. Diese wurden über einen Zeitraum von 80 min. in einem Wasserbad bei $43^{\circ}\text{C} \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ (definiert als starker Stress), oder bei $41^{\circ}\text{C} \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ (definiert als moderater Stress) inkubiert, bevor sie sich in einem Brutschrank bei 37°C in CO_2 -freier Atmosphäre über einen Zeitraum von 18 h regenerierten.

Parallel dazu wurden Kontrollinseln kontinuierlich bei 37°C im Brutschrank scheinbehandelt.

2.2.4 Ac-DEVD-Chloromethyl Ketone Vorbehandlung der Inselzellen

Quantifizierte Aliquots (2000 IEQ) frisch isolierter, gereinigter (Reinheitsgrad >90%) humaner und porziner Inselzellen wurden zur Evaluierung der inhibitorischen Potenz des irreversiblen Caspase-3 Hemmers Ac-DEVD-CMK (Calbiochem, Schwalbach, Germany) bei 37°C bzw. vor oder nach Hyperthermie (43°C) (2.2.3) vier Stunden in 200µM Ac-DEVD-CMK inkubiert. Vor Transplantation (2.2.6.3) erfolgte eine zweimalige Spülung der vorbehandelten Inselzellen mittels PBS.

2.2.5 Diabetesinduktion bei der Maus

Die Versuchstiere wurden nach einigen Tagen der Akklimation gewogen und durch farbliche Markierungen des Schwanzes gekennzeichnet. Nach Punktion einer lateralen Schwanzvene zur Blutentnahme und Bestimmung des postprandialen Blutglucosegehaltes (Glucose-Analyzer 2, Beckmann, München) erfolgte zur Induktion eines experimentellen Diabetes mellitus die Injektion von Streptozotocin in die laterale Schwanzvene der narkotisierten Maus.

2.2.6. Transplantation

2.2.6.1. Vorbereitung des Transplantats

Die aliquotierten Inselzellen wurden in Petrischalen oder Flachbodengläschen aus dem Brutschrank entnommen. Die Inselzellen wurden mittels einer Kolbenpipette (Eppendorf, Hamburg) in ein 0.5 ml Spitzbodenzentrifugenröhrchen (Eppendorf, Hamburg) überführt und bei 1xg mit HBSS gewaschen. Nach Sedimentation wurde das Gewebepellet mit einer Hamiltonspritze (Hamilton, Bonaduz) aspiriert. Das maximale Volumen betrug 30µl.

2.2.6.2. OP-Vorbereitung der Rezipienten

Vorbereitend auf die Transplantation wurden jeweils Gewicht und aktueller Blutzuckerspiegel der Tiere bestimmt und protokolliert (2.2.5). Anschließend wurden die Tiere durch Inhalation von Metoxyfluorane (Metofane*, Janssen-Cilag, Neuss) narkotisiert. Die gewünschte Narkosetiefe wurde durch intermediäre Metofane-Inhalation während der OP aufrechterhalten. Präoperativ wurden die Tiere beidseits lateral des Abdomens in Höhe des Nierenlagers rasiert.

2.2.6.3. OP Durchführung

Nachdem die Tiere die gewünschte Narkosetiefe erreicht hatten, wurde durch Tasten die Lage der Nieren erfasst. Anschließend wurde der Bereich desinfiziert und zunächst der

dorsolaterale Hautschnitt und daraufhin der Faszienchnitt durchgeführt.

Durch leichten Druck auf die Schnittstelle wurde die Niere nach außen luxiert und vorsichtig mit den Fingern fixiert. Während die Niere sich außerhalb des Peritoneums befand, wurde diese kontinuierlich mit isotonischer Kochsalzlösung befeuchtet, um ein Austrocknen des Gewebes zu verhindern.

Die Transplantation wurde mit der Punktion der dorsalen Seite der Niere begonnen, wobei die Nadel der Hamilton Spritze das gesamte Nierenparenchym bis hin zur ventralen Seite durchdrang. Dort lag sie direkt der Nierenkapsel an, ohne diese zu beschädigen. Die Inselzellsuspension wurde nun langsam injiziert, bis der gesamte Spritzeninhalt unter der Nierenkapsel plaziert war.

Die Kanüle wurde daraufhin zügig entfernt, um ein Zurücklaufen der Inselzellsuspension durch den Stichkanal möglichst gering zu halten. Nach Zurückverlagerung der Niere mit Naht der Muskel- und Faszien Schnitte (resorbierbares Nahtmaterial, Ethicon, Nordenstedt), wurde der Hautschnitt geklammert und mit Sprühpflaster versiegelt.

Als Aufwachraum diente ein isolierter Käfig mit Infrarotlichtbestrahlung.

2.2.6.4. Nephrektomie

Wie bei der Versuchsplanung vorgesehen, wurden die Tiere zu definierten Zeitpunkten mit einer intraperitonealen Injektion von Phenobarbital (Narcoren*) in Überdosis getötet. Nach dem Ausbluten wurden aus den getöteten Tieren beidseits die Nieren entfernt und anschließend der Insulinextraktion (2.2.5.5) zugeführt, um die initial transplantierte Insulinmenge mit dem aktuellen Insulingehalt des Transplantates zu vergleichen.

2.2.6.5. Insulinextraktion

Nach Organentnahme wurde das Inseltransplantat ohne Verluste aus dem umgebenden Nierengewebe geschält. Nach anschließender Homogenisierung mit einem Ultra-Turrax T8 (Jonke & Kunkel GmbH, Staufen) erfolgte eine Sonifizierung jeder Probe mit je 5 kurzen Impulsen (Power +315; Cycle 0.25). Nach Zentrifugation der Homogenisatproben (10 min, 4°C, 3000 xg) wurden 100 µl des Überstandes mit 900 µl IRI-Puffer neutralisiert.

Die Auswertung erfolgte nach Angaben des Herstellers mittels eines EIA-Kits (Enzyme Immunoassay; DRG Instruments GmbH, Marburg).

2.2.7. Western Blot Analyse

Die Analyse der untersuchten Proteine (HSP-27, -60, -70, -90, HO-I, Bax, Bcl-2, Fas, FasL, iNOS, Caspase-3, DFF) erfolgte

mittels Western Blot nach Vorbehandlung und Aliquotierung der Inselzellen in Petrischalen.

Zunächst wurden die 5000 – 10000 IEQ mit kalten HBSS gewaschen und anschliessend mit 500µl SDS verdünnt.

Nach Desintegration durch Sonifizierung (Power +315, Cycle 0.25; Joncke & Kunkel GmbH, Staufen) wurden die Proben zentrifugiert (4 min/3000xg/4°C). Der Überstand wurde abpipetiert und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die präparierten Proben wurden bis zur weiteren Verarbeitung bei -80°C gelagert.

Im weiteren Verlauf der Analyse wurden die gefrorenen Proben im kochenden Wasserbad bei 95°C aufgetaut, um der SDS-polyacrylamid Gel Elektrophorese [53] zugeführt werden zu können. Im Anschluss an den Transfer der Proteine [54] wurden die PVDF - Filter (Millipore, Badford, USA) für 30 min. mit 5% nonfat dried milk (Sigma, Deisenhofen) blockiert, mit PBS Lösung (Phosphate buffered solution) gewaschen und für 90 min. mit folgenden Antikörper inkubiert:

1. Monoklonalen anti-humanen Antikörpern gegen HSP 90 (Stressgen, Biomol, Hamburg).

2. Monoklonalen anti-humanen Antikörpern gegen HSP 70 (ABR, Dianova, Hamburg), Fas und FasL (Pharmingen, Heidelberg).
3. Polyklonale anti-humane Antikörper gegen (Bax, Bcl-2, HSP 60, HSP 27, iNOS (Stressgen), DFF (Pharmingen).
4. Polyklonale anti-humane Antikörper gegen HO-1 (Santa Cruz, Heidelberg).

Nach einer weiteren Spülung mit PBS versetzt mit 0,1% Tween-20, wurden die Filter für 60 min. in peroxidase-konjugiertem anti-Maus, anti-Kaninchen, anti-Ziege Sekundär-Antikörper (1:10000, Dako, Hamburg) inkubiert. Im Anschluss an eine letzte Spülung mit PBS, erfolgte die Entwicklung mit dem ECL-Detection System (Amersham, Braunschweig). Der entwickelte Film wurde gescannt und die Messung der Protein Expression in Arbitrary Units dargestellt ($AU = \text{area (mm}^2) \times \text{Dichte der Färbung}$). Unter Nutzung der Software AnalySIS (SIS, Stuttgart) wurde die Fläche und farbliche Dichte der Proteinbänder quantifiziert und in Relation zum eingesetzten Proteingehalt gesetzt, welcher durch den Detergent-Compatible DC-II Assay für Mikro-Protein Determination (Bio-Rad, München) ermittelt wurde. Die relative Proteinexpression bezieht sich auf scheinbehandelte Kontrollinseln, die kontinuierlich bei 37°C inkubiert wurden.

2.2.8 Statistische Datenanalyse

1. Die Analyse verbundener Stichproben ($n > 2$) erfolgte mittels Friedman Test. Bei Signifikanz der Ergebnisse ($p < 0.05$) erfolgte ein multipler Vergleich unter Anwendung des Wilcoxon-Tests.
2. Die Analyse nicht-verbundener Stichproben ($n > 2$) erfolgte mittels Kruskal-Wallis Test. Bei Signifikanz der Ergebnisse ($p < 0.05$) erfolgte ein multipler Vergleich unter Anwendung des Mann-Whitney Tests.
3. Die Überlebensanalyse wurde mittels Log-Rank Test ermittelt.

3. Ergebnisse

3.1 Versuchsablauf

Ziel der vorliegenden Arbeit war es Behandlungsformen zu evaluieren, die ein verbessertes Überleben von Langerhansschen Inselzellen in einem inflammatorischen Milieu ermöglichen.

Zu diesem Zweck wurden Inselzellen nach ihrer Isolation einer hyperthermen Stresssituation ausgesetzt, um die Synthese von Stressproteinen zu induzieren. Anschließend wurden die Inselzellen in normoglykämische sowie in diabetische Mäuse transplantiert, um ihre Funktion zu überprüfen.

3.2 Auswirkung von moderater und starker Hyperthermie auf die Proteinexpression isolierter Inselzellen

3.2.1 Auswirkungen von moderatem und starkem Stress auf die Expression von Hitzeschockproteinen

Der Vergleich der Proteinexpression mittels Western-Blot-Analyse erbrachte für HSP-60 und Hämoxxygenase I (HO-I) keine Beeinflussung durch moderate (41°C) oder starke (43°C) Hyperthermie.

Für HSP-27, HSP-70 und HSP-90 wurde eine signifikante, temperaturabhängige Hochregulation der basalen Proteinexpression von 3.57 ± 1.65 AU/ μ g, 13.34 ± 6.89 AU/ μ g und 2.44 ± 1.41 AU/ μ g nach Erhitzung der Inselzellen auf 41°C

oder 43°C beobachtet (**Abb. 1**), die für HSP-27 und HSP-70 besonders ausgeprägt war. Demgegenüber erschien die Überexpression von HSP-90 nach starker Hyperthermie im Vergleich zu moderater Hyperthermie nur gering ($P<0.05$).

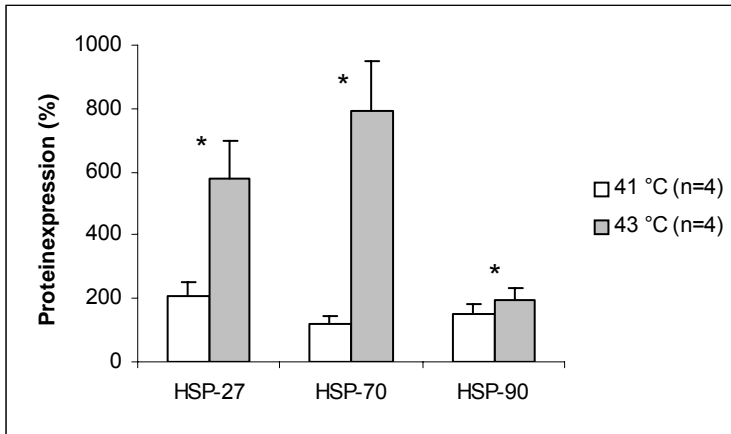


Abb.1 Einfluss von hyperthermen Stress auf den relativen Anstieg von HSP-27, -70 und -90 in Schweineinseln nach 80minütiger Hitzeexposition bei 41°C (weiße Balken) oder 43°C (graue Balken). * $P<0.05$ für 41°C vs. 43°C bezogen auf die jeweiligen Parameter kontinuierlich bei 37°C inkubierter Kontrollinseln.

3.2.2 Auswirkung von moderater und starker Hyperthermie auf die Expression pro- bzw. antiapoptotischer Proteine

Um die Auswirkung der Stressintensität auf die Induktion von Apoptose zu untersuchen, wurde die Expression von proapoptotischen Bax mit der von antiapoptotischen Bcl-2 nach moderaten und starken hyperthermen Stress verglichen. Um frühe Marker von Apoptose nach 80minütiger Hitzeexposition (43°C) zu verifizieren, wurden sowohl Kontroll- als auch hitzebehandelte Inselzellen, nach einer 18stündigen Regeneration bei 37°C, einer Doppelfärbung mit Annexin V und PI unterzogen. Diese erlaubte eine Differenzierung zwischen frühen und späten Apoptosestadien (**Tab. 1**).

	Annexin V	PI
frühe Apoptose	positiv	negativ
späte Apoptose	positiv	positiv
Nekrose	negativ	positiv

Tabelle 1 Unterscheidung früher und später Apoptosestadien mittels Doppelfärbung mit Annexin V und PI

Der Anteil Annexin V positiv gefärbter Inselzellen bei frisch isolierten Inselzellen lag bei $9.1 \pm 1.7\%$ ($n = 5$). Dieser erhöhte sich signifikant nach 37°C -Übernachtskultur auf $14.9 \pm 3.3\%$ (* $P < 0.05$ vs. basale Expression) und auf $12.2 \pm 4.1\%$ (* $P < 0.05$ vs. basale Expression) nach hyperthermer (43°C) Vorbehandlung der Inselzellen (**Abb. 2**).

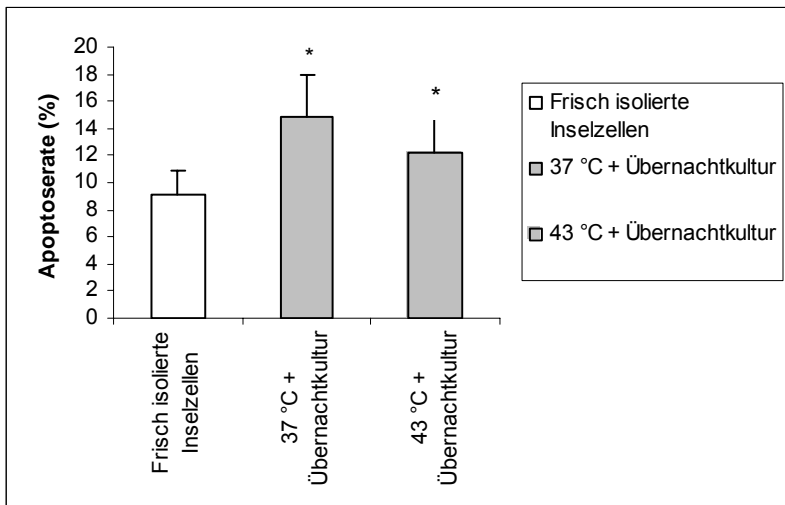


Abb.2 Apoptoseraten (in %) scheinbehandelter (grauer Balken) bzw. hyperthermisch (43°C) vorbehandelter (gestreifter Balken) Inselzellen nach Übernachtskultur. Als Kontrolle diente die Apoptoserate frisch isolierter Inselzellen (weißer Balken). * $P < 0.05$ für 37°C bzw. 43°C vs. frisch isolierte Inselzellen).

Zwischen den Apoptoseraten der Scheinbehandelten und hypertherm vorbehandelten Inselzellen bestand kein signifikanter Unterschied nach Übernachtskultur.

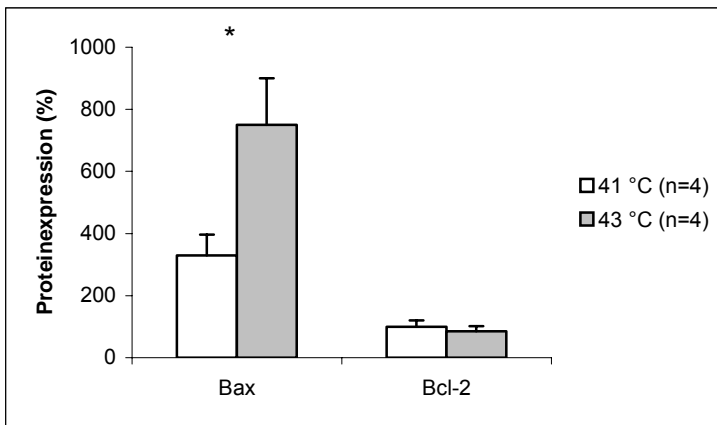


Abb. 3 Einfluss von hyperthermen Stress auf den relativen Anstieg von Bax und Bcl-2 in Schweineinseln nach 80minütiger Hitzeexposition bei 41°C (weiße Balken) oder 43°C (graue Balken). *P<0.05 für 41°C vs. 43°C bezogen auf die jeweiligen Parameter kontinuierlich bei 37°C inkubierter Kontrollinseln.

Die basale Expression von Bcl-2 (1.27 ± 0.49 AU/ μ g) wurde weder durch moderaten noch durch starken hyperthermen Stress signifikant beeinflusst (**Abb. 3**).

Im Gegensatz dazu unterschied sich die basale (0.062 ± 0.044 AU/ μ g) Expression von Bax nach moderaten bzw. starken hyperthermen Stress signifikant (* $P < 0.05$); (**Abb. 3**).

Das korrespondierende Verhältnis Bax zu Bcl-2 stieg entsprechend von 0.74 ± 0.59 nach moderater auf 1.67 ± 1.40 nach starker Hyperthermie signifikant (* $P < 0.05$); (**Abb.4**)

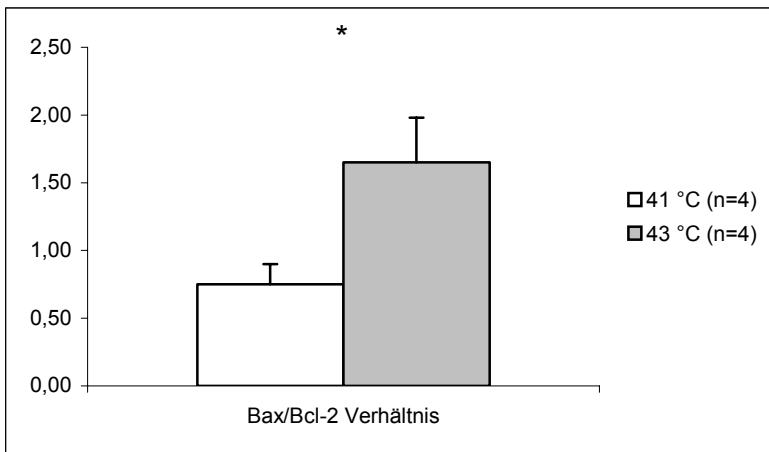


Abb.4 Einfluss von hyperthermen Stress auf das Bax/Bcl-2 Verhältnis nach 80minütiger Hitzeexposition bei 41°C (weiße Balken) oder 43°C (graue Balken). * $P < 0.05$ für 41°C vs. 43°C.

Entsprechend dem Anstieg der Bax-Expression, erhöhte sich die basale Expression der proapoptotischen Proteine Fas (0.91 ± 0.84 AU/ μ g) und FasL (0.075 ± 0.036 AU/ μ g) nach starker Hyperthermie um annähernd das vier- bzw. dreifache. Dagegen wurde nach moderater Hyperthermie ein Absinken der Expression von Fas und FasL beobachtet (* $P < 0.05$, 41°C vs. 43°C, **Abb.5**).

Die Expression von iNOS nach Hyperthermie war vergleichbar mit der von Fas und FasL. Verglichen mit der basalen Expression (4.69 ± 3.94 AU/ μ g) stieg iNOS nach moderater Hyperthermie nicht, nach starker Hyperthermie geringfügig an (**Abb.5**).

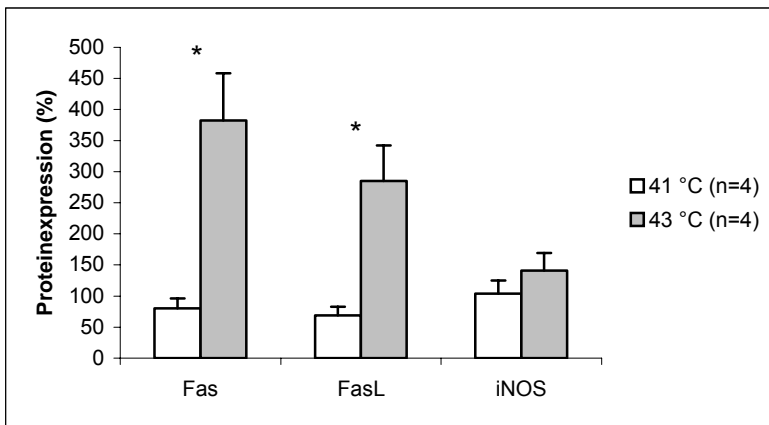


Abb. 5 Einfluss von hyperthermen Stress auf den relativen Anstieg von Fas, FasL und iNOS in Schweineinseln nach 80minütiger Hitzeexposition bei 41°C (weiße Balken) oder 43°C (graue Balken). * $P < 0.05$ für 41°C vs. 43°C bezogen auf die jeweiligen Parameter kontinuierlich bei 37°C inkubierter Kontrollinseln.

Die Aktivität des apoptotischen Effektorproteins Caspase-3 bestätigte die oben beschriebenen Ergebnisse. Während moderate Hyperthermie eine Erhöhung der basalen Caspase-3 Aktivität ($0.39 \pm 0.13 \mu\text{M}/\mu\text{g}/\text{h}$) um mehr als die Hälfte induzierte, stieg nach starker Hyperthermie die Aktivität um das nahezu vierfache an (**Abb.6**).

DFF ist ein apoptotisches Effektorprotein, welches mittels Spaltung durch Caspase-3 aktiviert wird. Wie **Abb.6**

verdeutlicht, wurde die basale DFF Expression von 3.29 ± 1.28 AU/ μ g durch moderaten hyperthermen Stress nicht beeinflusst, während sie nach starkem hyperthermen Stress nahezu verdoppelt wurde (* $P < 0.05$, 43°C vs. 37°C). Der Unterschied erreichte dabei statistische Signifikanz (* $P < 0.05$, 41°C vs. 43°C).

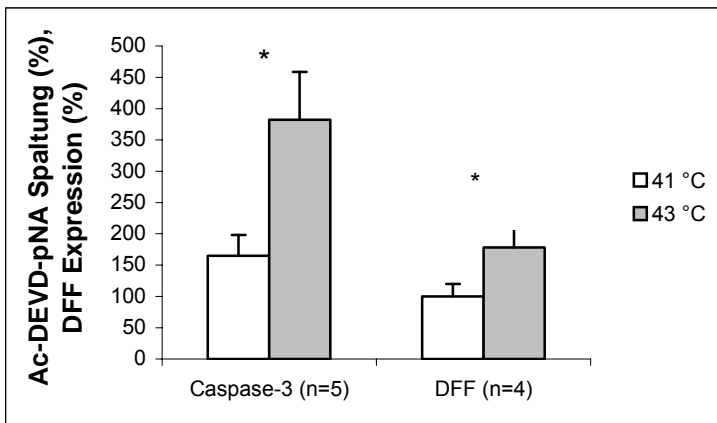


Abb.6 Einfluss von hyperthermen Stress auf den Anstieg der Caspase-3 Aktivität und Expression von DFF in Schweineinseln nach 80minütiger Hitzeexposition bei 41°C (weiße Balken) oder 43°C (graue Balken). * $P < 0.05$ für 41°C vs. 43°C bezogen auf die jeweiligen Parameter kontinuierlich bei 37°C inkubierter Kontrollinseln.

3.3 Einfluss einer hyperthermischen Inselkonditionierung auf die Insulinwiedergewinnung nach Transplantation in nichtdiabetische Mäuse

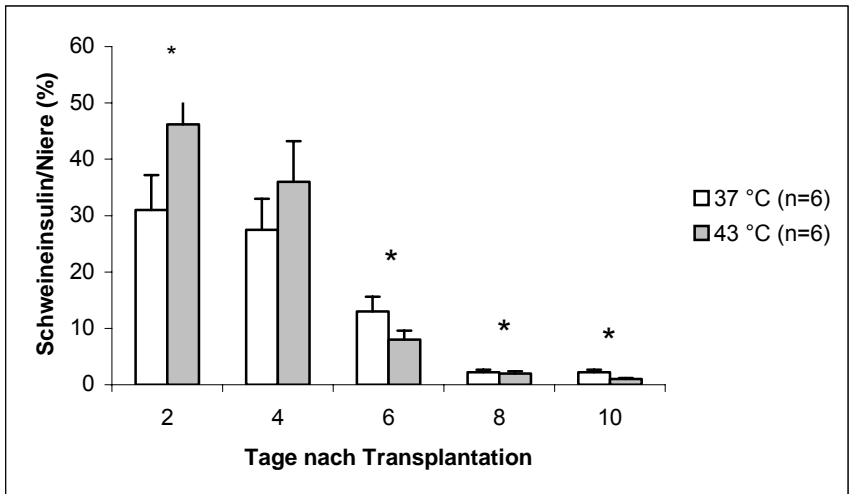


Abb.7 Wiedergewinnung von initial transplantiertem Insulin aus scheinbehandelten (weiße Balken) bzw. hitzebehandelten (graue Balken) Schweineinseln 2, 4, 6, 8 und 10 Tage nach simultaner Transplantation unter die kontralaterale Nierenkapsel von nichtdiabetischen C57/Bl6j Mäusen (* $P < 0.05$, 37°C vs. 43°C).

Es zeigte sich ein kontinuierlicher Verlust von Insulin nach simultaner Transplantation von Kontroll- bzw. hitzeexponierten Inselzellen in denselben Empfänger. Der Insulingehalt

verringerte sich von initial $0.834 \pm 0.056\text{U}$ in Kontrollinseln bzw. $0.901 \pm 0.014\text{U}$ in hypertherm vorbehandelten Inseln (NS, 37°C vs. 43°C) auf letztlich $0.020 \pm 0.012\text{U}$ bzw. $0.013 \pm 0.008\text{U}$ ($*P < 0.05$, 37°C vs. 43°C). Der zunächst positive Effekt einer Hitzeexposition, der an den Tagen 2 und 4 im Vergleich zu Kontrollinseln zu beobachten war, kehrte sich ab Tag 6 zugunsten der scheinbehandelten Inselzellen um, was bis zum Ende der Versuchsreihe an Tag 10 signifikant ($*P < 0.05$, 37°C vs. 43°C) bestehen blieb.

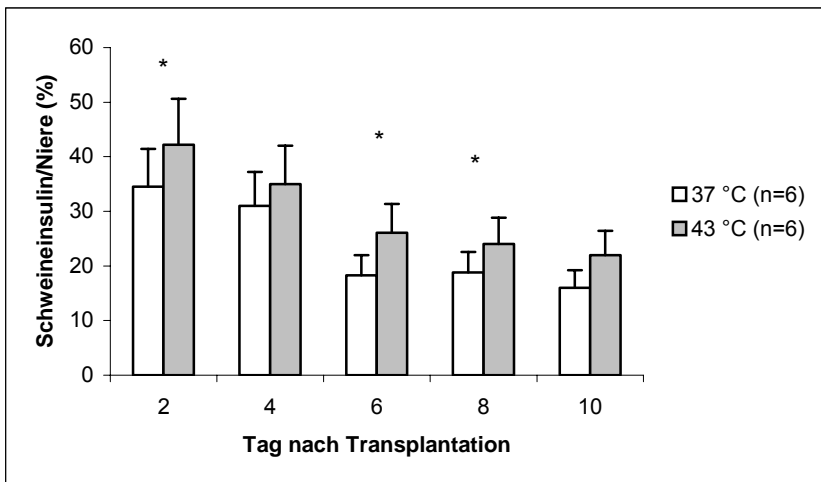


Abb.8 Wiedergewinnung von initial transplantiertem Insulin aus scheinbehandelten (weiße Balken) bzw. hitzebehandelten (graue Balken) Schweineinseln 2, 4, 6, 8 und 10 Tage nach simultaner Transplantation unter die kontralaterale

Nierenkapsel von nichtdiabetischen, thymusaplastischen NMRI Mäusen (* $P < 0.05$, 37°C vs. 43°C).

Wie **Abb.7** und **Abb.8** verdeutlichen, war der Gesamtverlust von initial transplantierten Schweineinsulin in immuninkompetenten NMRI Mäusen über den Beobachtungszeitraum geringer als in immunkompetenten Mäusen (Abb.7). Nach einem über 50%igen Verlust an Tag 2 nach Transplantation blieb der Insulingehalt in den Nieren relativ konstant. Es wurde ebenfalls deutlich, dass der Insulingehalt der vorbehandelten Transplantate den der Kontrollinseln an den Tagen 2, 6 und 8 statistisch signifikant (* $P < 0.05$, 37°C vs. 43°C) überstieg.

3.4 Einfluss einer hyperthermen Inselvorbehandlung auf die Transplantatfunktion in diabetischen C57/Bl6j Mäusen

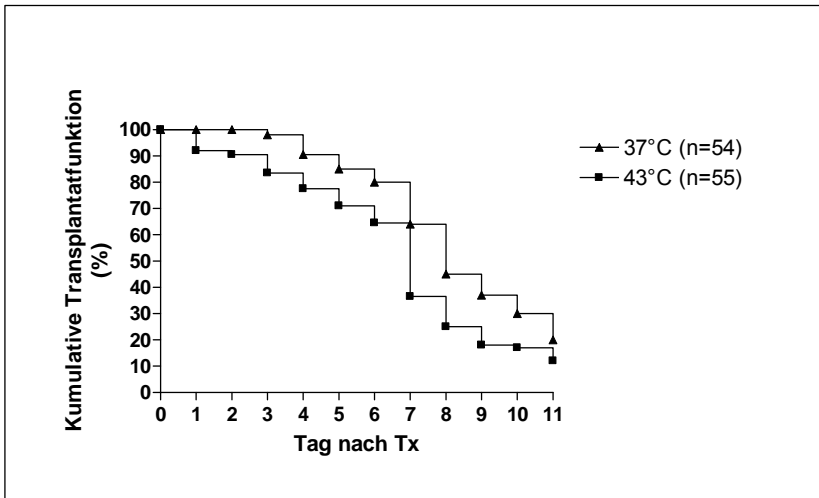


Abb.9 Kumulative Transplantatfunktion von hitzeexponierten (43°C) bzw. scheinbehandelten (37°C) Schweineinseln in diabetischen C57/Bl6j Mäusen nach Transplantation unter die linke Nierenkapsel. $P < 0.01$ 37°C vs. 43°C, Log-Rank Test.

Wie **Abb. 9** veranschaulicht, zeigten hypertherm vorbehandelte Schweineinseln eine signifikant verringerte Transplantatfunktion im Vergleich zu Kontrollinseln ($P < 0.01$ 37°C vs. 43°C, Log-Rank-Test). Der nahezu parallele Funktionsverlauf der beiden Gruppen wurde zwischen Tag 6 und 7 durch einen stärkeren Transplantatverlust bei den hitzegeschockten Inselzellen unterbrochen, um dann auf

einem niedrigeren Niveau wieder nahezu parallel zu den Kontrollinseln zu verlaufen.

3.5 Einfluss von DEVD-CMK auf Funktion und Wiedergewinnung von transplantierten Inselzellen

3.5.1 *Insulinextraktion nach Transplantation in nichtdiabetische C57/Bl6j Mäuse*

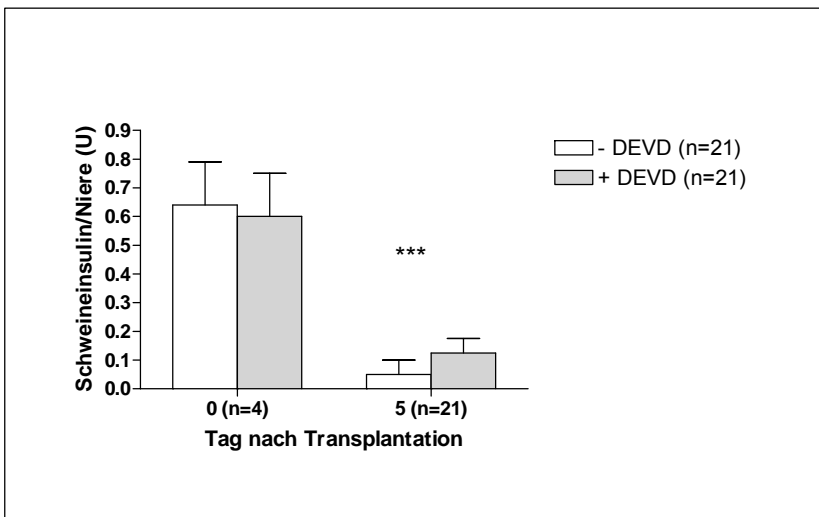


Abb.10 Insulingehalt DEVD vorbehandelter porziner Inselzellen nach Inkubation bei 37°C vor und nach Transplantation in nichtdiabetische C57/Bl6j Mäuse. Als Kontrolle dienten die jeweils ohne DEVD inkubierten bzw.

transplantierten Inselzellen. Die Insulinextraktion erfolgte nach Nephrektomie der transplantattragenden Niere 5 Tage nach Transplantation ($***P < 0.001$ ohne DEVD vs. mit DEVD).

Abb.10 zeigt, dass es keinen Unterschied im Insulingehalt nach 4stündiger Vorinkubation mit DEVD bei 37°C gab. Die hier gewonnenen Werte dienten als Ausgangswerte für die weiteren Untersuchungen.

Im Vergleich zu den Ausgangswerten war die prozentuale Wiedergewinnung von transplantiertem Insulin 5 Tage nach Transplantation, in DEVD – vorbehandelten Inselzellen signifikant ($P < 0.001$, Wilcoxon-Test) höher als in den Kontrollinselzellen (**Abb.10**).

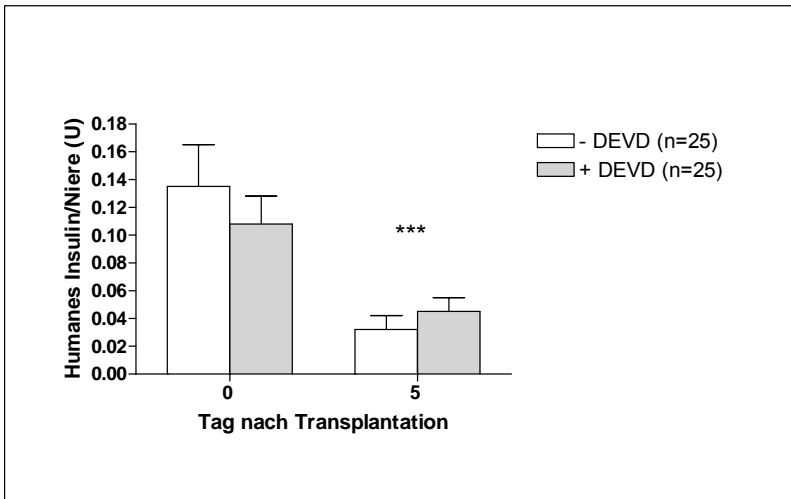


Abb.11 Insulingehalt DEVD vorbehandelter humaner Inselzellen vor und nach Transplantation in nichtdiabetische C57/Bl6j Mäuse. Als Kontrolle dienten scheinbehandelte, transplantierte Inselzellen. Die Insulinextraktion erfolgte nach Nephrektomie der transplantattragenden Niere 5 Tage nach Transplantation.

(*** $P < 0.001$ ohne DEVD vs. mit DEVD).

Analog zu den Ergebnissen bei Schweineinselzellen verhält sich die Entwicklung des Insulingehaltes bei humanen Inselzellen:

Abb.11 zeigt, dass es keinen Unterschied im Insulingehalt nach 4stündiger Vorinkubation mit DEVD gab. Die hier

gewonnenen Werte dienten als Ausgangswerte für die weiteren Untersuchungen.

Beim Vergleich der prozentual wiedergewonnenen Insulinmenge, die wir aus C57/Bl6j Mausnieren 5 Tage nach Transplantation in nichtdiabetische Tiere gewinnen konnten, ergibt sich ein hochsignifikanter ($P < 0.001$ ohne vs. mit DEVD, Wilcoxon-Test) Unterschied zwischen den unbehandelten und den mit DEVD inkubierten Inselzellen (**Abb.11**).

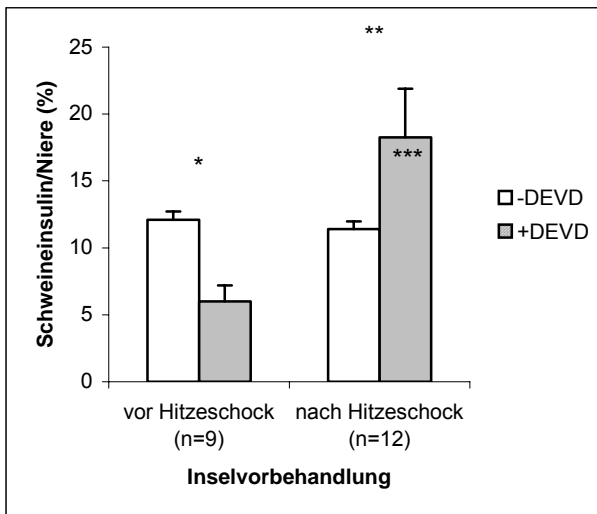


Abb.12 Relative Wiederfindung von initial transplantiertem Insulin in Schweineinseln nach 4stündiger Inkubation mit bzw. ohne DEVD vor bzw. nach Hyperthermie (43°C). (* $P < 0.05$ ohne DEVD vs. mit DEVD; ** $P < 0.01$ 43°C ohne

DEVD vs. 43°C mit DEVD; *** $P < 0.001$ nach Hyperthermie vs. vor Hyperthermie).

Der Zeitpunkt der Applikation des Apoptosehemmers DEVD hatte einen signifikanten Einfluss auf die Insulinwiedergewinnung nach Transplantation von Schweineinseln in nichtdiabetische C57/Bl6j Mäuse. Es wurde deutlich, dass die Insulinwiedergewinnung vom Zeitpunkt der Inkubation in DEVD (vor bzw. nach Hyperthermie) abhängt.

Eingesetzt vor Hyperthermie war die Insulinwiedergewinnung signifikant ($P < 0.05$ 37°C ohne DEVD vs. 37°C mit DEVD, Wilcoxon-Test) geringer als in der Gruppe ohne DEVD. Im Gegensatz dazu hatte die Behandlung der Inseln mit DEVD nach Hyperthermie einen signifikant ($P < 0.05$ 43°C ohne DEVD vs. 43°C mit DEVD, Wilcoxon-Test) positiven Effekt auf die Wiedergewinnung von Insulin.

3.5.2 Funktion von vorbehandelten porzinen Inselzellen nach Transplantation in diabetische C57/Bl6j Mäuse

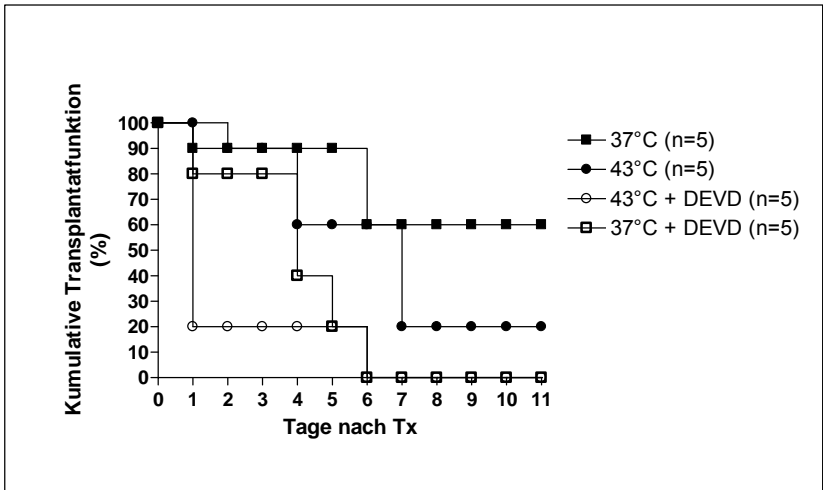


Abb.13 Kumulative Transplantatfunktion von hitzeexponierten (43°C) bzw. scheinbehandelten (37°C) mit DEVD vorbehandelten Schweineinseln in diabetischen C57/Bl6j Mäusen nach Transplantation unter die linke Nierenkapsel. Als Kontrolle dienten die jeweils ohne Zusatz von DEVD transplantierten Inselzellen.

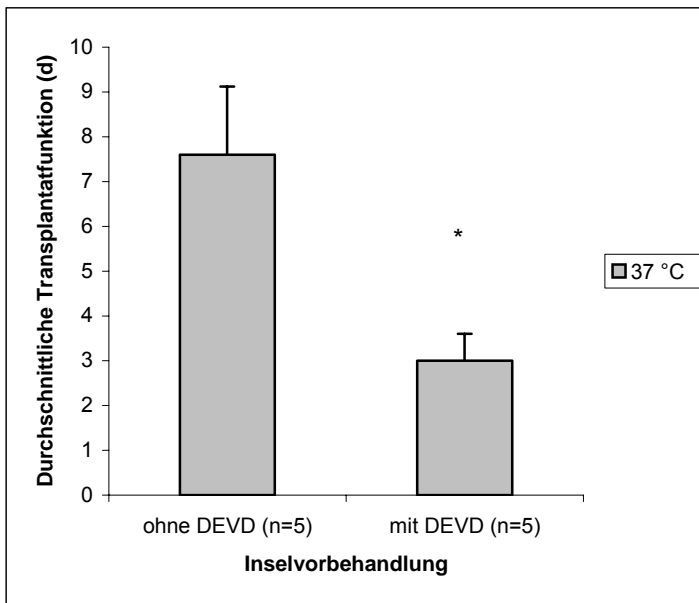


Abb.14 Durchschnittliche Funktionsdauer mit DEVD vorbehandelter Schweineinselzellen nach Transplantation in diabetische C57/Bl6j Mäuse. Als Kontrolle dienten 37°C Inselzellen ohne Zusatz von DEVD.

Wie **Abb.13** veranschaulicht, zeigten 3 von 5 diabetischen C57/Bl6j Mäusen Normoglykämie über den gesamten Beobachtungszeitraum nach Transplantation von unbehandelten, bei 37°C inkubierten, Inselzellen. Wurde den scheinbehandelten Inselzellen der Apoptosehemmer DEVD hinzugefügt, erreichte keines der Tiere Normoglykämie über den fünften Tag hinaus.

Empfänger, die mit hitzegeschockten Inseln transplantiert wurden, erreichten in 20% der Fälle eine normoglykämische Stoffwechselsituation über den Beobachtungszeitraum von 11 Tagen. Der zusätzliche Einsatz von DEVD in dieser Gruppe führte zu einer Verschlechterung der Transplantatfunktion. Am sechsten Tag nach Transplantation zeigte keines der Tiere eine Transplantatfunktion.

Abb.14 macht deutlich, dass die mittlere Transplantatfunktion von 37°C Inselzellen, die mit dem Apoptosehemmer DEVD behandelt wurden, signifikant schlechter war, als die von 37°C Inselzellen ohne Vorbehandlung.

4. Diskussion

Wesentliche Ziele der Inselzell-Transplantation sind einerseits die Herstellung der Homöostase des Glukosestoffwechsels und andererseits die damit verbundene Prophylaxe von Spätschäden in Form der Neuro-, Mikro- und Makroangiopathie sowie von Wahrnehmungsstörungen beim Auftreten hypoglykämischer Episoden. Als Endziel gilt eine Wiederherstellung der völligen Insulinunabhängigkeit [55, 56]. Um dieses Ziel zu erreichen, müssen jedoch in den meisten Fällen mehr als zwei Spenderorgane pro Patient prozessiert werden, damit die Bereitstellung einer ausreichend großen Inselzellzahl ($>10,000$ IEQ/kg/KG) gewährleistet werden kann. Die Ursache hierfür liegt in der Minderversorgung des initial nicht vaskularisierten Transplantates mit Sauerstoff und Nährstoffen im proinflammatorischen Milieu der Leber.

Lokale Makrophagen (Kupfferzellen), die mit Cytokinen (IL-1 β , TNF α , IFN γ) sowie NO und Sauerstoffradikalen, auf das Transplantat reagieren, stellen die wesentlichen Noxen dar. Diese unspezifischen Abwehrmechanismen führen zu einem frühen Versagen bzw. einer Dysfunktion durch einen signifikanten Verlust transplantierte Inselzellen.

Natürlicherweise besitzen Zellen die Fähigkeit auf subletalen Stress der unterschiedlichsten Art mit der Synthese von Hitzeschockproteinen zu reagieren. Eine gezielte Induktion der

Hitzeschockproteinsynthese in isolierten Inselzellen resultiert in einer höheren Resistenz gegenüber inflammatorischen Stress nach Transplantation. HSP-70 konnte als ein wichtiger Vertreter dieser protektiven Proteine identifiziert werden [57-60].

Dieser universelle Verteidigungsmechanismus wird auch in der experimentellen Transplantationsmedizin eingesetzt:

So konnte gezeigt werden, dass eine kurze, ischämische Periode nach Explantation, sowie eine zusätzliche lokale Erhitzung, die Funktionalität von Spenderherzen nach Transplantation verbessern [61]. Nach Herztransplantation zeigten Patienten mit guter ventrikulärer Funktion eine höhere HSP Expression als Patienten mit einer vergleichbar schlechteren Ventrikelfunktion [62, 63]. Gleichzeitig konnte gezeigt werden, dass die Wahrscheinlichkeit einer Organabstoßung negativ mit der HSP Expression der Myozyten korrelierte [63]. Diese vielversprechenden Ergebnisse scheinen im Wesentlichen mit der verbesserten Funktion myokardialer Mitochondrien nach Transplantation verknüpft zu sein, die durch eine vermehrte Expression von Hitzeschockproteinen gewährleistet wurde.

Reperfusionsschäden sind die häufigste Ursache für den Verlust eines Lebertransplantates. In den letzten Jahren konnte eine Vielzahl tierexperimenteller Studien zeigen, dass

die Vorbehandlung von Spenderlebern mittels kurzzeitiger Ischämie, mildem oxidativem Stress oder Hyperthermie die Resistenz gegen Reperfusionsschäden nach Transplantation erhöhen konnte [64, 65]. Die Synthese von Hitzeschockproteinen spielte dabei die wesentliche Rolle, die in einer besseren Perfusion der Lebersinusoiden, einer Hemmung der Neutrophilenimmigration sowie einer Reduktion der Synthese proinflammatorischer Cytokine resultierte [66].

Die Hitzeschockproteinsynthese wird durch unterschiedliche Reize induziert. Abhängig von der einwirkenden Intensität werden unterschiedliche Proteine synthetisiert, deren Identifikation Ziel aktueller Untersuchungen ist. In isolierten Inselzellen konnten unter der großen Anzahl von Hitzeschockproteinen lediglich einige wenige identifiziert werden [67, 68].

4.1 Auswirkungen moderater und starker Hyperthermie auf die Proteinexpression isolierter Inselzellen

Das verminderte Überleben von Inselzelltransplantaten nach erhöhter HSP Expression, führt zu der Vermutung, dass starker Stress auch zu einer Co-Expression proapoptotischer Proteine wie Bax, Caspase-3, DFF und vor allem Fas und FasL führt.

Das Gleichgewicht zwischen proapoptotischen Bax und antiapoptotischen Bcl-2 sorgt für eine Stabilisierung der Mitochondrienmembran. Bei einem Ungleichgewicht zugunsten von Bax setzt freigesetztes Cytochrom C die Caspasekaskade in Gang. Die Caspasen werden in einer proteolytischen Reaktion aktiviert an deren Ende die Aktivierung von Caspase-3 als finalem Apoptose-Exekutor steht [69]. Über Spaltung von DNA fragmentierenden Faktor (DFF) [70] wird die Fragmentierung der chromosomalen DNA initiiert.

Die Ligation zwischen Fas und FasL führt ebenso zu einer Initiierung der genannten proteolytischen Caspasekaskade. FasL wird entweder auf stimulierten zytotoxischen T-Zellen oder auf Spenderinselzellen exprimiert. Wie in humanen Inselzellen gezeigt, kann eine Fas-Expression durch zellulären Stress in Form von Cytokinen [71, 72] und erhöhter Glukosekonzentrationen [73] hervorgerufen werden.

Im Gegensatz zu humanen Inselzellen konnten wir bei isolierten porzinen Inselzellen eine konstitutive Expression von Fas feststellen. Ungeklärt blieb in diesem Zusammenhang, ob diese Beobachtung spezifisch für porcine Inselzellen ist, oder ob die basale Fas-Expression durch das Isolationsverfahren hervorgerufen wird [74].

Diese Beobachtungen verdeutlichen das ambivalente Verhalten der zellulären Antwort auf Stress. Offensichtlich

werden sowohl Mechanismen zur Protektion als auch zur Selbstzerstörung simultan gestartet.

Ein weiteres Beispiel für die Dualität der Stressantwort von Zellen ist die induzierbare NO-Synthase (iNOS).

Aufgrund des modulatorischen Einflusses auf NO mit seinen verschiedenen zytotoxischen und protektiven Funktionen, besitzt iNOS sowohl die Fähigkeit apoptotische Prozesse zu initiieren als auch zu hemmen [75]. In isolierten Inselzellen von Nagern und Menschen kann die Expression von iNOS durch Zytokinkombinationen induziert werden [76, 77].

In der vorliegenden Studie konnte nachgewiesen werden, dass starke Hyperthermie ebenfalls zu einer Erhöhung der basalen iNOS-Expression führt. Obwohl sich die Steigerung der iNOS-Expression als statistisch nicht relevant erwies, könnte dies ein Hinweis darauf sein, dass unterschiedliche Arten von Stress über einen gemeinsamen Mechanismus wirken.

Auf der anderen Seite konnte gezeigt werden, dass eine Erhöhung der HSP-Expression in Zellen eine Schutzfunktion gegenüber Apoptose ausüben kann [78, 79].

Die Divergenz zwischen den Resultaten verschiedener Arbeitsgruppen kann möglicherweise durch die Anwendung

unterschiedlicher Protokolle zur hyperthermen Stressinduktion, bezüglich der Höhe der Temperatur und der Dauer der Hyperthermie, erklärt werden. Um diese Frage wenigstens teilweise zu erklären, wurden in der vorliegenden Untersuchung die Auswirkungen von moderaten und starken Stress auf Inselzellen untersucht.

Es zeigte sich, dass moderater Stress (41°C), mit Ausnahme von Bax, zwar zu einer geringeren Expression proapoptotischer Proteine in porzinen Inselzellen führte, jedoch auch keine maximale HSP-Expression erreicht werden konnte. Dagegen schien moderater Stress zu einer Erniedrigung der basalen Expression von porzinem Fas und FasL zu führen.

Die Veränderungen welche durch den geringen Unterschied zwischen moderatem (41°C±0,5°C) und starkem (43°C±0,5°C) hyperthermen Stress hervorgerufen werden, verdeutlichen eindrucksvoll den schmalen Grad zwischen Protektion und Selbstzerstörung [80].

Der initiale Trigger für die gesteigerte Hitzeschockprotein-Expression der Inselzellen nach hyperthermer Behandlung scheint dabei eine Erhöhung der intrazellulären Konzentration freier Radikale zu sein [81]. Ein intrazellulär prooxidativer Zustand wurde durch proapoptotische Mediatoren wie Cytokine [69, 70] und Arsen [82] infolge einer Freisetzung von

Sauerstoffradikalen erreicht. Unsere Untersuchungen zeigen, dass die Induktion von Hitzeschockproteinen durch den Einsatz effektiver Antioxidantien, wie N-Acetyl-Cystein, komplett inhibiert werden kann.

Eine Erklärung für die Anfälligkeit isolierter Inselzellen gegenüber apoptotischen Mechanismen, könnte in ihrer artifizialen Umgebung liegen, die den Inselzellen nur unzureichende Bedingungen zur Aufrechterhaltung des Zellmetabolismus unter Stress bietet [30, 74].

4.2 Einfluss hyperthermer Vorbehandlung auf die Insulinwiederfindung nach Inselzelltransplantation in nichtdiabetische und diabetische Mäuse

Nach intraportaler Transplantation sind die Inselzellen dem proinflammatorischen Milieu der Leber ausgesetzt. Unspezifische inflammatorische Reaktionen, die unmittelbar nach Transplantation einsetzen, führen zu einem hohen Verlust bzw. zur Fehlfunktion der Inselzellen [38]. Dabei ist es vor allem die Freisetzung von Cytokinen (IL-1 β , TNF α , IFN γ) und toxischen Sauerstoff bzw. NO-Verbindungen aus lokalen Makrophagen (Kupffer Zelle), die wesentlichen Anteil am Transplantatversagen hat.

Da Inselzellen in Voruntersuchungen einen geringeren Gehalt an antioxidativen Verteidigungsmechanismen im Vergleich zu anderen Geweben aufwiesen, scheint eine Stressantwort durch Synthese von Hitzeschockproteinen von essentieller Bedeutung für die frühe Funktion transplanteder Inselzellen zu sein. Aber auch für den initialen Verlauf der Autoimmununsulitis bei Diabetes mellitus Typ I kommt dieser Reaktion eine wesentliche Bedeutung zu [83-86].

Diese Arbeitshypothese konnte an isolierten Schweine- und Ratteninseln in vitro klar bestätigt werden. Durch die hyperthermische Induktion von HSP70 konnte ein verbessertes Überleben gegenüber inflammatorischen

Mediatoren wie NO, H₂O₂ und Streptozotozin erzielt werden [45, 46].

Gründe für das verbesserte Überleben der hitzebehandelten Inselzellen wurden in einer Aufrechterhaltung des intrazellulären Energielevels gesehen. Hierzu zählte die Inhibition des Verlustes von intrazellulärem NADH⁺ bzw. NADPH⁺ als Energieäquivalente zur Erzeugung von ATP, welche schon in Vorversuchen an Nagerinseln ihre protektive Wirkung zeigten [45].

Scarim et al. [87] beschrieben einen weiteren Aspekt der Hitzeschockproteininduktion sowohl in Ratten-, als auch in humanen Inselzellen. Dabei wurde der protektive Effekt von HSP70 der Inhibition der IL-1 β stimulierten, induzierbaren NO-Synthase (iNOS) zugeschrieben.

Zur Induktion von HSP70 wurde für beide Inselzellpopulationen eine Behandlung mit 42°C mit einer Dauer von 60 min für Ratten- sowie 90 min für humane Inselzellen gewählt. Aussagen hinsichtlich der Stärke der HSP70 Expression wurden nicht gemacht.

Gleichzeitig macht es der simultane, signifikante Anstieg von HSP27 und HSP90, der in der vorliegenden Arbeit nachgewiesen wurde, unwahrscheinlich, dass die Schutzfunktion, wie von der Mehrheit der Autoren

angenommen, lediglich durch HSP70 vermittelt wird. Aufgrund vorhergehender Untersuchungen an Tumorzelllinien konnte angenommen werden, dass auch HSP27 eine wichtige Rolle in der zellulären, antiinflammatorischen Selbstverteidigung von Inselzellen spielt [78, 88].

Des Weiteren bleibt zu klären, ob aufgrund der relativ geringen Expression von HSP90 angenommen werden kann, dass HSP90 lediglich eine unbedeutende Rolle in der Verteidigung transplanterter Inselzellen spielt. Versuche konnten zeigen, dass HSP27 und HSP70 in hitzegeschockten Zellen in nächster Nähe ribosomaler Strukturen agieren [89, 90], während HSP90 eher für die physiologische Translokation aktivierter Steroidhormone in den Nukleus zuständig zu sein scheint [91].

Während die diskutierten positiven Effekte vor allem auf in vitro Versuchen beruhen, zeigen die Transplantationsversuche der vorliegenden Arbeit eindeutig die negativen Effekte einer hyperthermischen Vorbehandlung der Inselzellen auf.

So zeigte sich eine Verminderung der Insulinwiederfindung in zuvor hitzebehandelten Inselzellen nach Transplantation unter die kontralaterale Nierenkapsel im Vergleich zu simultan transplantierten Kontrollinseln um bis zu 30%.

Für die Beurteilung der vorliegenden Resultate sind somit mehrere, vermutlich simultan ablaufende Reaktionen bzw. Effekte zu berücksichtigen:

1. Erhöhte antiinflammatorische Resistenz.
2. Erniedrigte Angiogenese und Vaskularisierung des Transplantates. Ein Mechanismus der zum verfrühten Transplantatversagen hitzeexponierter Inselzellen führt, könnte in der Verringerung der Vaskularisierung transplanterter Inselzellen und in der Verminderung der Sauerstoff und Nährstoffversorgung liegen. Ein Beleg für diese Hypothese wurde durch die Transplantation von hypertherm vorbehandelten Hamsterinseln in eine Hauttasche syngener Empfänger geliefert [92]. Die intravitale Mikroskopie konnte zeigen, dass die Neovaskularisierung von zuvor hypertherm behandelten Inselzellen signifikant geringer war als in unbehandelten Inselzellen. Unsere Beobachtung, dass in immuninkompetenten Nacktmäusen die Insulinwiederfindung über den gesamten Beobachtungszeitraum in hypertherm vorbehandelten Inselzellen höher war als in der Kontrollgruppe sprach allerdings gegen die These, dass eine hyperthermische Vorbehandlung die Angiogenese bei transplantierten Inselzellen einschränkte.

3. Erhöhte Transplantatimmunogenität. Wie an Herzmuskelzellen nachgewiesen [63] könnte eine verstärkte Präsentation von Hitzeschockproteinen an der Zelloberfläche der Inselzellen zu einer signifikanten Erhöhung der Transplantatimmunogenität und der nachfolgenden Reaktionen führen.
4. Erhöhte Expression proapoptotischer Proteine. Möglicherweise könnte auch die Expression von proapoptotischen Proteinen wie Fas und FasL auf hitzeexponierten Inselzellen im Rahmen der T-Zell vermittelten Immunantwort wesentlich zum frühen Transplantatversagen beitragen. Diese Abwehrsysteme konnten als CD4⁺CD8⁺γδ TCR exprimierende T-Zell Subpopulationen identifiziert werden, welche als erste Immunreaktion selbst den unspezifischen Makrophagen voransteht [93, 94]. Die erhöhte Expression von Fas als proapoptotischen Effektorprotein auf humanen Zellen im inflammatorischen Milieu [71, 72] deutet daraufhin, dass durch eine Hitzeexposition auch eine Fas-induzierte Steigerung der Apoptose hervorgerufen wurde, die über eine Ligations mit FasL auf CD- aber auch auf Inselzellen und anschließender Aktivierung der Caspasekaskade vermittelt wurde. In der

vorliegenden Studie konnte diese Korrelation ebenfalls nachgewiesen werden.

In Übereinstimmung mit diesen Untersuchungen konnte in der vorliegenden Versuchsreihe in vivo gezeigt werden, dass in der sehr frühen Phase nach Transplantation (Tag 2 und Tag 4) zwar mehr hypertherm vorbehandelte Inselzellen überlebten als Kontrollinselnzellen, dass sich dieser positive Effekt im weiteren Verlauf der Untersuchung (Tag 6, 8, 10) jedoch umkehrte.

In ihrer Gesamtheit schienen die unterschiedlichen, simultan ablaufenden Reaktionen zu einer negativen Bilanz zu führen, was einen ersten Erklärungsansatz für die frühe Fehlfunktion hypertherm vorbehandelter Inselzellen im Tiermodell lieferte. Unsere Ergebnisse im Modell der diabetischen C57/Bl6j Maus konnten diese Thesen unterstreichen.

4.3 Auswirkungen von DEVD-CMK auf das Überleben und die in vivo Funktion transplanteder Schweineinselzellen

Um die Frage zu klären, wie stark apoptotische Prozesse beim frühen Transplantatverlust involviert sind, wurden Kontrollinselzellen und hyperthermisch vorbehandelte Inselzellen mit dem Caspase-3 Inhibitor Ac-DEVD-CMK vorinkubiert.

Die Effektivität von Ac-DEVD-CMK als Inhibitor von Apoptose konnte in verschiedenen Versuchen demonstriert werden.

Grunenfelder et al. zeigte an allogenen Herztransplantaten im Rattenmodell die Möglichkeiten der Behandlung mit DEVD-CMK. Hierbei wurden sowohl Spender, Empfänger als auch das Spendergewebe selbst mit hochdosiertem DEVD vorbehandelt [95]. Die Vorbehandlung mit dem Apoptosehemmer resultierte in einer signifikanten Mehrexpression von Bcl-2, sowie einer gleichzeitigen Reduktion der TNF α Expression auf Basalniveau.

Auch die Glutamat-induzierte Caspase-3 Aktivität in Retinazellen der Ratte konnte durch DEVD-CMK drastisch inhibiert werden, was zu einer signifikanten Senkung der Apoptoserate führte [96].

Diese Befunde stehen in Übereinstimmung mit den Ergebnissen der vorliegenden Studie.

Durch die Inselzellbehandlung mit Ac-DEVD-CMK vor Transplantation in nichtdiabetische Empfänger konnte eine signifikante Verbesserung der Insulinwiederfindung sowohl für porzine als auch für humane Inselzellen erreicht werden.

Bei hitzegeschockten Inselzellen war der Zeitpunkt der DEVD-Applikation von entscheidender Bedeutung für die Insulinwiederfindung in nichtdiabetischen Mäusen. Eingesetzt vor Hitzeexposition war die Insulinwiederfindung signifikant geringer als in der Kontrollgruppe, während die DEVD Behandlung nach Hyperthermie einen signifikant positiven Effekt auf die Wiedergewinnung von Insulin im Vergleich zu unbehandelten Inselzellen hatte.

Trotz dieser Ergebnisse zeigte die Wiederholung dieser Versuche in diabetischen Mäusen einen signifikant negativen Einfluss der DEVD-Vorbehandlung auf den Transplantationserfolg bei hitzegeschockten sowie bei Kontrollinselnzellen.

Den Widerspruch zwischen den Resultaten in nichtdiabetischen und diabetischen Mäusen aufzuklären ist Gegenstand laufender Untersuchungen. Hierbei scheint ein Einfluss von Ac-DEVD-CMK auf die Spaltung von Proinsulin

eine Rolle zu spielen [97]. Eine gesteigerte Proinsulinsekretion scheint ein signifikanter Prädiktor für ein verfrühtes Transplantatversagen zu sein [98]. Möglicherweise liegt hierbei ein β -Zell spezifischer Effekt von DEVD vor, der bisher nicht in anderen Geweben nachgewiesen wurde. Weitere Untersuchungen zu dieser Thematik sind bisher nicht bekannt.

5. Zusammenfassung

1. Der Bedarf an isoliertem Inselgewebe zum Erreichen einer langfristigen Insulinunabhängigkeit bei transplantierten Typ I Diabetikern wird durch das proinflammatorische Milieu der Leber als Implantationsort für isolierte Inselzellen signifikant erhöht.
2. Ziel der vorliegenden Arbeit war es, das Überleben und die Funktionrate transplanterter Schweineinseln durch hyperthermische Induktion von Hitzeschockproteinen zu verbessern.
3. Nebender Expression verschiedener Hitzeschockproteine wie HSP-27, -70, -90 wurde auch ein Anstieg der Expression proapoptotischer Proteine und der Caspase-3 Aktivität gemessen.
4. Die Vorbehandlung transplanterter Inselzellen mit dem Caspase-3 Inhibitor Ac-DEVD-CMK resultierte in einer erhöhten Überlebensrate in nicht-diabetischen Mäusen, senkte aber gleichzeitig die Funktionsrate des Transplantates in diabetischen Mäusen.

5. Die Daten der vorliegenden Arbeit zeigen, dass starker hyperthermischer Stress eine duale Zellantwort produziert, die in der erhöhten Expression protektiver und proapoptotischer Proteine resultiert,
6. Die mögliche Hemmung terminaler, apoptotischer Effektorproteine durch spezifische Inhibitoren bedarf einer weiteren Evaluierung.

6. Summary

1. The need for isolated islet cells to achieve long term insulin independence in IDDM patients after intraportal transplantation is significantly increased due to the proinflammatory situation in the microenvironment of the host organ.
2. The aim of the presented study was initially to improve survival and function of transplanted porcine islet cells by hyperthermic induction of heat shock proteins.
3. Beside the expression of the heat shock proteins HSP-27, -70, -90 an increased expression of proapoptotic proteins and caspase-3 activity was observed.
4. The pre-treatment of transplanted porcine and human islet cells with the caspase-3 inhibitor Ac-DEVD-CMK results in an increased survival rate in non-diabetic mice, while in diabetic mice the function of the islet cells is reduced.
5. The presented data show that severe hyperthermic stress results in the simultaneous expression of pro- and antiapoptotic proteins.

6. The potential inhibition of proapoptotic effector proteins by specific inhibitors needs further evaluation.

7. Referenzen

1. Bretzel, R.G., in Giessener Universitätsblätter. 2001/02.
2. Banting, F.G. and C.H. Best, Pancreatic extracts. 1922. J Lab Clin Med, 1990. 115(2): p. 254-72.
3. DeWitt, D.E. and I.B. Hirsch, Outpatient insulin therapy in type 1 and type 2 diabetes mellitus: scientific review. Jama, 2003. 289(17): p. 2254-64.
4. Bretzel, R.G., Pathogenese und Therapie des Diabetes mellitus. Med. Welt, 1985: p. 36: 927.
5. Hasslacher, C., et al., Similar risks of nephropathy in patients with type I or type II diabetes mellitus. Nephrol Dial Transplant, 1989. 4(10): p. 859-63.
6. Bretzel, R.G., Hering BJ, Federlin KF, Islet transplantation registry report 1991. Diab Nutr Metab, 1992. 5 suppl: p. 177 - 181.
7. Morel, P., et al., Long-term glucose control in patients with pancreatic transplants. Ann Intern Med, 1991. 115(9): p. 694-9.
8. Steffes, M.W., et al., Beta-cell function and the development of diabetes-related complications in the diabetes control and complications trial. Diabetes Care, 2003. 26(3): p. 832-6.
9. Kelly, W.D., et al., Allotransplantation of the pancreas and duodenum along with the kidney in diabetic nephropathy. Surgery, 1967. 61(6): p. 827-37.

10. Robertson, R.P., et al., Pancreas and islet transplantation for patients with diabetes. *Diabetes Care*, 2000. 23(1): p. 112-6.
11. Bolinder, J., et al., Improved glucose counterregulation after pancreas transplantation in diabetic patients with unawareness of hypoglycemia. *Transplant Proc*, 1991. 23(1 Pt 2): p. 1667-9.
12. Navarro, X., et al., Neuropathy and mortality in diabetes: influence of pancreas transplantation. *Muscle Nerve*, 1996. 19(8): p. 1009-16.
13. Tyden, G., et al., Improved survival in patients with insulin-dependent diabetes mellitus and end-stage diabetic nephropathy 10 years after combined pancreas and kidney transplantation. *Transplantation*, 1999. 67(5): p. 645-8.
14. Wilczek, H.E., et al., Evolution of diabetic nephropathy in kidney grafts. Evidence that a simultaneously transplanted pancreas exerts a protective effect. *Transplantation*, 1995. 59(1): p. 51-7.
15. Fioretto, P., et al., Reversal of lesions of diabetic nephropathy after pancreas transplantation. *N Engl J Med*, 1998. 339(2): p. 69-75.
16. Nakache, R., G. Tyden, and C.G. Groth, Long-term quality of life in diabetic patients after combined pancreas-kidney transplantation or kidney transplantation. *Transplant Proc*, 1994. 26(2): p. 510-1.

17. Drognitz, O. and U.T. Hopt, [Pancreas transplantation: a survey on indications, surgical techniques, immunosuppression, complications and outcome]. *Zentralbl Chir*, 2003. 128(10): p. 821-30.
18. Tyden, G., J. Tollemar, and J. Bolinder, Combined pancreas and kidney transplantation improves survival in patients with end-stage diabetic nephropathy. *Clin Transplant*, 2000. 14(5): p. 505-8.
19. Hopt, U.T. and O. Drognitz, Pancreas organ transplantation. Short and long-term results in terms of diabetes control. *Langenbecks Arch Surg*, 2000. 385(6): p. 379-89.
20. Becker, B.N., et al., Simultaneous pancreas-kidney and pancreas transplantation. *Minerva Urol Nefrol*, 2002. 54(4): p. 213-26.
21. Al-Shurafa, H.A., et al., Innovations in pancreas transplantation. *Saudi Med J*, 2002. 23(3): p. 265-71.
22. Mohan, P., et al., Improved patient survival in recipients of simultaneous pancreas-kidney transplant compared with kidney transplant alone in patients with type 1 diabetes mellitus and end-stage renal disease. *Br J Surg*, 2003. 90(9): p. 1137-41.
23. Gruessner, R.W., et al., The surgical risk of pancreas transplantation in the cyclosporine era: an overview. *J Am Coll Surg*, 1997. 185(2): p. 128-44.
24. Woehrle, M., et al., The influence of the culture temperature on insulin release, antigen expression

- and allograft survival of islets of Langerhans. *Horm Metab Res Suppl*, 1990. 25: p. 96-100.
25. Shapiro, A.M., et al., Islet transplantation in seven patients with type 1 diabetes mellitus using a glucocorticoid-free immunosuppressive regimen. *N Engl J Med*, 2000. 343(4): p. 230-8.
 26. Ryan, E.A., et al., Clinical outcomes and insulin secretion after islet transplantation with the Edmonton protocol. *Diabetes*, 2001. 50(4): p. 710-9.
 27. Contreras, J.L., et al., Brain death significantly reduces isolated pancreatic islet yields and functionality in vitro and in vivo after transplantation in rats. *Diabetes*, 2003. 52(12): p. 2935-42.
 28. Lakey, J.R., et al., Variables in organ donors that affect the recovery of human islets of Langerhans. *Transplantation*, 1996. 61(7): p. 1047-53.
 29. Lakey, J.R., et al., Effect of core pancreas temperature during cadaveric procurement on human islet isolation and functional viability. *Transplantation*, 2002. 73(7): p. 1106-10.
 30. Vajkoczy, P., et al., Angiogenesis and vascularization of murine pancreatic islet isografts. *Transplantation*, 1995. 60(2): p. 123-7.
 31. Vargas, F., et al., Endotoxin contamination may be responsible for the unexplained failure of human pancreatic islet transplantation. *Transplantation*, 1998. 65(5): p. 722-7.

32. Thomas, F., et al., An improved technique for isolating pig islets: the importance of tensegrity in islet long-term culture viability. *Transplant Proc*, 1999. 31(1-2): p. 633-4.
33. Eckhardt, T., et al., Endotoxin impairs the engraftment of rat islets transplanted beneath the kidney capsule of C57BL/6-mice. *J Mol Med*, 1999. 77(1): p. 123-5.
34. Jahr, H., et al., Activation of human complement by collagenase and ficoll. *Exp Clin Endocrinol Diabetes*, 1995. 103 Suppl 2: p. 27-9.
35. Paraskevas, S., et al., Apoptosis occurs in freshly isolated human islets under standard culture conditions. *Transplant Proc*, 1997. 29(1-2): p. 750-2.
36. Goto, M., et al., Low-molecular weight dextran sulfate abrogates the instant blood-mediated inflammatory reaction induced by adult porcine islets both in vitro and in vivo. *Transplant Proc*, 2004. 36(4): p. 1186-7.
37. Goto, M., et al., Low molecular weight dextran sulfate prevents the instant blood-mediated inflammatory reaction induced by adult porcine islets. *Transplantation*, 2004. 77(5): p. 741-7.
38. Bottino, R., et al., Transplantation of allogeneic islets of Langerhans in the rat liver: effects of macrophage depletion on graft survival and microenvironment activation. *Diabetes*, 1998. 47(3): p. 316-23.
39. Stevens, R.B., et al., Role of nitric oxide in the pathogenesis of early pancreatic islet dysfunction

- during rat and human intraportal islet transplantation. *Transplant Proc*, 1994. 26(2): p. 692.
40. Wu, G., et al., Pig islet xenograft rejection is markedly delayed in macrophage-depleted mice: a study in streptozotocin diabetic animals. *Xenotransplantation*, 2000. 7(3): p. 214-20.
 41. El-Ouaghlidi, A., et al., Cytokine mRNA expression in peripheral blood cells of immunosuppressed human islet transplant recipients. *J Mol Med*, 1999. 77(1): p. 115-7.
 42. Brandhorst, D., et al., Prevention of early islet graft failure by selective inducible nitric oxide synthase inhibitors after pig to nude rat intraportal islet transplantation. *Transplantation*, 2001. 71(2): p. 179-84.
 43. Welch, W.J., et al., Response of mammalian cells to metabolic stress; changes in cell physiology and structure/function of stress proteins. *Curr Top Microbiol Immunol*, 1991. 167: p. 31-55.
 44. Bellmann, K., et al., Heat shock protein hsp70 overexpression confers resistance against nitric oxide. *FEBS Lett*, 1996. 391(1-2): p. 185-8.
 45. Bellmann, K., et al., Heat shock induces resistance in rat pancreatic islet cells against nitric oxide, oxygen radicals and streptozotocin toxicity in vitro. *J Clin Invest*, 1995. 95(6): p. 2840-5.

46. Brandhorst, D., et al., Pretransplant induction of HSP-70 in isolated adult pig islets decreases early islet xenograft survival. *Cell Transplant*, 2000. 9(3): p. 423-30.
47. Brandhorst, D., et al., Hyperthermic preconditioning protects pig islet grafts from early inflammation but enhances rejection in immunocompetent mice. *Cell Transplant*, 2003. 12(8): p. 859-65.
48. Brandhorst, D., et al., High-dosed nicotinamide decreases early graft failure after pig to nude rat intraportal islet transplantation. *Transplantation*, 2002. 73(1): p. 74-9.
49. Heller, B., et al., Analysis of oxygen radical toxicity in pancreatic islets at the single cell level. *Biol Chem Hoppe Seyler*, 1994. 375(9): p. 597-602.
50. Brandhorst, D., et al., Islet isolation from the pancreas of large mammals and humans: 10 years of experience. *Exp Clin Endocrinol Diabetes*, 1995. 103 Suppl 2: p. 3-14.
51. Brandhorst, D., et al., Influence of donor data and organ procurement on human islet isolation. *Transplant Proc*, 1994. 26(2): p. 592-3.
52. Ricordi, C., et al., Islet isolation assessment in man and large animals. *Acta Diabetol Lat*, 1990. 27(3): p. 185-95.

53. Laemmli, U.K., Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 1970. 227(259): p. 680-5.
54. Towbin, H., T. Staehelin, and J. Gordon, Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1979. 76(9): p. 4350-4.
55. Warnock, G.L., et al., Normoglycaemia after transplantation of freshly isolated and cryopreserved pancreatic islets in type 1 (insulin-dependent) diabetes mellitus. *Diabetologia*, 1991. 34(1): p. 55-8.
56. Socci, C., et al., Fresh human islet transplantation to replace pancreatic endocrine function in type 1 diabetic patients. Report of six cases. *Acta Diabetol*, 1991. 28(2): p. 151-7.
57. Burkart, V., et al., Natural resistance of human beta cells toward nitric oxide is mediated by heat shock protein 70. *J Biol Chem*, 2000. 275(26): p. 19521-8.
58. Wachlin, G., et al., Stress response of pancreatic islets from diabetes prone BB rats of different age. *Autoimmunity*, 2002. 35(6): p. 389-95.
59. Rothe, H. and H. Kolb, Strategies of protection from nitric oxide toxicity in islet inflammation. *J Mol Med*, 1999. 77(1): p. 40-4.
60. Langer, T. and W. Neupert, Heat shock proteins hsp60 and hsp70: their roles in folding, assembly and

- membrane translocation of proteins. *Curr Top Microbiol Immunol*, 1991. 167: p. 3-30.
61. Kevelaitis, E., et al., Backtable heat-enhanced preconditioning: a simple and effective means of improving function of heart transplants. *Ann Thorac Surg*, 2001. 72(1): p. 107-12; discussion 112-3.
 62. Jayakumar, J., et al., Gene therapy for myocardial protection: transfection of donor hearts with heat shock protein 70 gene protects cardiac function against ischemia-reperfusion injury. *Circulation*, 2000. 102(19 Suppl 3): p. III302-6.
 63. Suzuki, K., et al., Heat shock treatment enhances graft cell survival in skeletal myoblast transplantation to the heart. *Circulation*, 2000. 102(19 Suppl 3): p. III216-21.
 64. Shimabukuro, T., et al., Induction of heat shock response: effect on the rat liver with carbon tetrachloride-induced fibrosis from ischemia-reperfusion injury. *World J Surg*, 1998. 22(5): p. 464-8; discussion 468-9.
 65. Matsumoto, K., K. Honda, and N. Kobayashi, Protective effect of heat preconditioning of rat liver graft resulting in improved transplant survival. *Transplantation*, 2001. 71(7): p. 862-8.
 66. Carini, R. and E. Albano, Recent insights on the mechanisms of liver preconditioning. *Gastroenterology*, 2003. 125(5): p. 1480-91.

67. Andersen, H.U., et al., Two-dimensional gel electrophoresis of rat islet proteins. Interleukin 1 beta-induced changes in protein expression are reduced by L-arginine depletion and nicotinamide. *Diabetes*, 1995. 44(4): p. 400-7.
68. John, N.E., et al., Cytokine- or chemically derived nitric oxide alters the expression of proteins detected by two-dimensional gel electrophoresis in neonatal rat islets of Langerhans. *Diabetes*, 2000. 49(11): p. 1819-29.
69. Yamada, K., et al., Essential role of caspase-3 in apoptosis of mouse beta-cells transfected with human Fas. *Diabetes*, 1999. 48(3): p. 478-83.
70. Liu, X., et al., DFF, a heterodimeric protein that functions downstream of caspase-3 to trigger DNA fragmentation during apoptosis. *Cell*, 1997. 89(2): p. 175-84.
71. Loweth, A.C., et al., Human islets of Langerhans express Fas ligand and undergo apoptosis in response to interleukin-1beta and Fas ligation. *Diabetes*, 1998. 47(5): p. 727-32.
72. Stassi, G., et al., Nitric oxide primes pancreatic beta cells for Fas-mediated destruction in insulin-dependent diabetes mellitus. *J Exp Med*, 1997. 186(8): p. 1193-200.

73. Maedler, K., et al., Glucose induces beta-cell apoptosis via upregulation of the Fas receptor in human islets. *Diabetes*, 2001. 50(8): p. 1683-90.
74. Rosenberg, L., et al., Structural and functional changes resulting from islet isolation lead to islet cell death. *Surgery*, 1999. 126(2): p. 393-8.
75. Brune, B., A. von Knethen, and K.B. Sandau, Nitric oxide and its role in apoptosis. *Eur J Pharmacol*, 1998. 351(3): p. 261-72.
76. Delaney, C.A., et al., Cytokines induce deoxyribonucleic acid strand breaks and apoptosis in human pancreatic islet cells. *Endocrinology*, 1997. 138(6): p. 2610-4.
77. Rabinovitch, A., et al., Cytotoxic effects of cytokines on rat islets: evidence for involvement of free radicals and lipid peroxidation. *Diabetologia*, 1992. 35(5): p. 409-13.
78. Samali, A. and T.G. Cotter, Heat shock proteins increase resistance to apoptosis. *Exp Cell Res*, 1996. 223(1): p. 163-70.
79. Mehlen, P., K. Schulze-Osthoff, and A.P. Arrigo, Small stress proteins as novel regulators of apoptosis. Heat shock protein 27 blocks Fas/APO-1- and staurosporine-induced cell death. *J Biol Chem*, 1996. 271(28): p. 16510-4.

80. Boreham, D.R., et al., Heat-induced thermal tolerance and radiation resistance to apoptosis in human lymphocytes. *Biochem Cell Biol*, 1997. 75(4): p. 393-7.
81. Gorman, A.M., et al., Antioxidant-mediated inhibition of the heat shock response leads to apoptosis. *FEBS Lett*, 1999. 445(1): p. 98-102.
82. Chen, Y.C., S.Y. Lin-Shiau, and J.K. Lin, Involvement of reactive oxygen species and caspase 3 activation in arsenite-induced apoptosis. *J Cell Physiol*, 1998. 177(2): p. 324-33.
83. Asayama, K., N.W. Kooy, and I.M. Burr, Effect of vitamin E deficiency and selenium deficiency on insulin secretory reserve and free radical scavenging systems in islets: decrease of islet manganosuperoxide dismutase. *J Lab Clin Med*, 1986. 107(5): p. 459-64.
84. Grankvist, K., S.L. Marklund, and I.B. Taljedal, CuZn-superoxide dismutase, Mn-superoxide dismutase, catalase and glutathione peroxidase in pancreatic islets and other tissues in the mouse. *Biochem J*, 1981. 199(2): p. 393-8.
85. Lenzen, S., J. Drinkgern, and M. Tiedge, Low antioxidant enzyme gene expression in pancreatic islets compared with various other mouse tissues. *Free Radic Biol Med*, 1996. 20(3): p. 463-6.

86. Malaisse, W.J., et al., Determinants of the selective toxicity of alloxan to the pancreatic B cell. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1982. 79(3): p. 927-30.
87. Scarim, A.L., M.R. Heitmeier, and J.A. Corbett, Heat shock inhibits cytokine-induced nitric oxide synthase expression by rat and human islets. *Endocrinology*, 1998. 139(12): p. 5050-7.
88. Jaattela, M. and D. Wissing, Heat-shock proteins protect cells from monocyte cytotoxicity: possible mechanism of self-protection. *J Exp Med*, 1993. 177(1): p. 231-6.
89. Welch, W.J. and J.P. Suhan, Cellular and biochemical events in mammalian cells during and after recovery from physiological stress. *J Cell Biol*, 1986. 103(5): p. 2035-52.
90. Arrigo, A.P., J.P. Suhan, and W.J. Welch, Dynamic changes in the structure and intracellular locale of the mammalian low-molecular-weight heat shock protein. *Mol Cell Biol*, 1988. 8(12): p. 5059-71.
91. Kimmins, S. and T.H. MacRae, Maturation of steroid receptors: an example of functional cooperation among molecular chaperones and their associated proteins. *Cell Stress Chaperones*, 2000. 5(2): p. 76-86.
92. Schramm, R., et al., Heat shock preconditioning impairs revascularization of freely transplanted

- pancreatic islets. *Transplantation*, 2002. 74(11): p. 1544-50.
93. Kaufmann, S.H. and D. Kabelitz, Gamma/delta T lymphocytes and heat shock proteins. *Curr Top Microbiol Immunol*, 1991. 167: p. 191-207.
 94. Wick, G., et al., Is atherosclerosis an immunologically mediated disease? *Immunol Today*, 1995. 16(1): p. 27-33.
 95. Grunenfelder, J., et al., Upregulation of Bcl-2 through caspase-3 inhibition ameliorates ischemia/reperfusion injury in rat cardiac allografts. *Circulation*, 2001. 104(12 Suppl 1): p. I202-6.
 96. Chen, T.A., et al., Inhibition of caspase-3-like activity reduces glutamate induced cell death in adult rat retina. *Brain Res*, 2001. 904(1): p. 177-88.
 97. Brandhorst D, A.A., Kumarasamy V, Maataoui A, Brendel MD, Bretzel RG, Brandhorst H, Pretreatment with Caspase-3 inhibitors increases xenograft function of transplanted human and porcine islets. *Transplantation*, 2004.
 98. Piemonti, L., et al., Effects of cryopreservation on in vitro and in vivo long-term function of human islets. *Transplantation*, 1999. 68(5): p. 655-62.

8. Anhang

8.1 Abkürzungen

Abb	Abbildung
athym	athymisch
d	Tage
diab	diabetisch
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EIA	Enzymimmunoassay
g	Gramm
h	Stunde
HBSS	Hank's Balanced Salt Solution
HSP	Hitzeschockprotein
IDDM	insulin dependant diabetes mellitus
IEQ	Inseläquivalente
IL	Interleukin
iNOS	induzierbare Stickoxyd Synthase
IRI	immunreaktives Insulin
Kap	Kapitel
kD	kilo Dalton (Einheit des Molekulargewichts)
KG	Körpergewicht
kg	Kilogramm
l	Liter
m	Milli
M	Mol
μ	Mikro
MHC	Major Histocompatibility Complex
min	Minute
mRNA	Messenger Ribonukleinsäure
n	Anzahl
NA	Nikotinamid
NO	Stickoxyd
Op	Operation
RIA	Radio Immuno Assay
sec	Sekunde
U	unit
STZ	Streptozotocin
Tab	Tabelle

TNF
TX
vs

Tumornekrosefaktor
Transplantation
versus

8.2 Tabellen

Tab.1 Unterscheidung früher und später Apoptosestadien mittels Doppelfärbung mit Annexin V und PI (**Seite 38**)

8.3 Abbildungen

Abb.1 Einfluss von hyperthermen Stress auf den relativen Anstieg von HSP-27, -70 und -90 in Schweineinseln nach 80minütiger Hitzeexposition bei 41°C (weiße Balken) oder 43°C (graue Balken). *P<0.05 für 41°C vs. 43°C bezogen auf die jeweiligen Parameter kontinuierlich bei 37°C inkubierter Kontrollinseln. (**Seite 37**)

Abb.2 Apoptoseraten (in %) scheinbehandelter (grauer Balken) bzw. hyperthermisch (43°C) vorbehandelter (gestreifter Balken) Inselzellen nach Übernachtskultur. Als Kontrolle diente die Apoptoserate frisch isolierter Inselzellen (weißer Balken). *P<0.05 für 37°C bzw. 43°C vs. frisch isolierte Inselzellen). (**Seite 39**)

Abb.3 Einfluss von hyperthermen Stress auf den relativen Anstieg von Bax und Bcl-2 in Schweineinseln nach 80minütiger Hitzeexposition bei 41°C (weiße Balken) oder 43°C (graue Balken). *P<0.05 für 41°C vs. 43°C bezogen auf die jeweiligen Parameter kontinuierlich bei 37°C inkubierter Kontrollinseln. (**Seite 40**)

Abb.4 Einfluss von hyperthermen Stress auf das Bax/Bcl-2 Verhältnis nach 80minütiger Hitzeexposition bei 41°C (weiße Balken) oder 43°C (graue Balken). *P<0.05 für 41°C vs. 43°C. **(Seite 41)**

Abb.5 Einfluss von hyperthermen Stress auf den relativen Anstieg von Fas, FasL und iNOS in Schweineinseln nach 80minütiger Hitzeexposition bei 41°C (weiße Balken) oder 43°C (graue Balken). *P<0.05 für 41°C vs. 43°C bezogen auf die jeweiligen Parameter kontinuierlich bei 37°C inkubierter Kontrollinseln. **(Seite 43)**

Abb.6 Einfluss von hyperthermen Stress auf den Anstieg der Caspase-3 Aktivität und Expression von DFF in Schweineinseln nach 80minütiger Hitzeexposition bei 41°C (weiße Balken) oder 43°C (graue Balken). *P<0.05 für 41°C vs. 43°C bezogen auf die jeweiligen Parameter kontinuierlich bei 37°C inkubierter Kontrollinseln. **(Seite 44)**

Abb.7 Wiedergewinnung von initial transplantiertem Insulin aus scheinbehandelten (weiße Balken) bzw. hitzebehandelten (graue Balken) Schweineinseln 2, 4, 6, 8 und 10 Tage nach simultaner Transplantation unter die kontralaterale Nierenkapsel von nichtdiabetischen C57/Bl6j Mäusen (*P<0.05, 37°C

vs. 43°C). **(Seite 45)**

Abb.8 Wiedergewinnung von initial transplantierten Insulin aus scheinbehandelten (weiße Balken) bzw. hitzebehandelten (graue Balken) Schweineinseln 2, 4, 6, 8 und 10 Tage nach simultaner Transplantation unter die kontralaterale Nierenkapsel von nichtdiabetischen, thymusaplastischen NMRI Mäusen (*P<0.05, 37°C vs. 43°C). **(Seite 46)**

Abb.9 Kumulative Transplantatfunktion von hitzeexponierten (43°C) bzw. scheinbehandelten (37°C) Schweineinseln in diabetischen C57/Bl6j Mäusen nach Transplantation unter die linke Nierenkapsel. P<0.01 37°C vs. 43°C, Log-Rank Test. **(Seite 48)**

Abb.10 Insulingehalt DEVD vorbehandelter porziner Inselzellen nach Inkubation bei 37°C vor und nach Transplantation in nichtdiabetische C57/Bl6j Mäuse. Als Kontrolle dienten die jeweils ohne DEVD inkubierten bzw. transplantierten Inselzellen. Die Insulinextraktion erfolgte nach Nephrektomie der transplantattragenden Niere 5 Tage nach Transplantation (***P<0.001 ohne DEVD vs. mit DEVD). **(Seite 49)**

Abb.11 Insulingehalt DEVD vorbehandelter humaner Inselzellen vor und nach Transplantation in nichtdiabetische C57/Bl6j Mäuse. Als Kontrolle dienten scheinbehandelte, transplantierte Inselzellen. Die Insulinextraktion erfolgte nach Nephrektomie der transplantattragenden Niere 5 Tage nach Transplantation ($***P < 0.001$ ohne DEVD vs. mit DEVD). **(Seite 51)**

Abb.12 Relative Wiederfindung von initial transplantiertem Insulin in Schweineinseln nach 4stündiger Inkubation mit bzw. ohne DEVD vor bzw. nach Hyperthermie (43°C). ($*P < 0.05$ ohne DEVD vs. mit DEVD; $**P < 0.01$ 43°C ohne DEVD vs. 43°C mit DEVD; $***P < 0.001$ nach Hyperthermie vs. vor Hyperthermie). **(Seite 52)**

Abb.13 Kumulative Transplantatfunktion von hitzeexponierten (43°C) bzw. scheinbehandelten (37°C) mit DEVD vorbehandelten Schweineinseln in diabetischen C57/Bl6j Mäusen nach Transplantation unter die linke Nierenkapsel. Als Kontrolle dienten die jeweils ohne Zusatz von DEVD transplantierten Inselzellen. **(Seite 54)**

Abb.14 Durchschnittliche Funktionsdauer mit DEVD
vorbehandelter Schweineinselnzellen nach
Transplantation in diabetische C57/Bl6j Mäuse. Als
Kontrolle dienten 37°C Inselzellen ohne Zusatz von
DEVD. **(Seite 55)**

9. Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Maataoui
Vorname: Adel
Geburtstag: 14.02.1976
Geburtsort: Braunschweig
Familienstand: verheiratet



Staatsangehörigkeit: deutsch

Anschrift: Bischofsheimer Strasse 4,
60326 Frankfurt am Main

Schulische Ausbildung

1982 - 1986 Grundschule in Braunschweig
1986 - 1987 Orientierungsstufe in
 Braunschweig
1987 – 1995 Gymnasium in Markgröningen
 (Baden-Württemberg)
1996 – 2002 Studium der Humanmedizin
 an der JLU Gießen

Hochschulstudium

März 1998 Physikum

März 1999	1. Staatsexamen
März 2001	2. Staatsexamen
Mai 2002	3. Staatsexamen

Famulaturen

September 1999	Laborfamulatur in der Med. Poliklinik der JLU Giessen unter Leitung von Professor Bretzel mit den Schwerpunkten Diabetologie/ Diabetestherapie
März 2000	Famulatur in der Med. Poliklinik der JLU Giessen unter Leitung von Professor Stracke mit den Schwerpunkten Endokrinologie/ Stoffwechselstörungen
August 2000	Famulatur in der unfallchirurgischen Abteilung der JLU Giessen unter Leitung von Professor Schnettler
September 2000	Famulatur in der orthopädischen Praxis von Dr. Pörschke in Gießen mit dem Schwerpunkt Manuelle Therapie

Praktisches Jahr

April – Dez.2001	1. PJ – Tertial in der diagnostischen Radiologie der JLU Giessen unter Leitung von Professor Dr. med. Rau
Aug. – Dez.2001	2. PJ – Tertial in der Abteilung der Inneren Medizin der JLU Giessen unter Leitung von Professor Dr. med. Breithaupt

Dez. – März 2002	3. PJ – Tertial in der chirurgischen Abteilung des Klinikums Wetzlar Braunfels unter Leitung von Professor Dr. med. Brobmann
------------------	---

Berufliche Tätigkeit

Seit Feb. 2003	Wissenschaftlicher Assistent an der Johann – Wolfgang – Goethe Universität Frankfurt am Main unter der Leitung Dr. med. Vogl (Zentrum für Diagnostische und Interventionelle Radiologie)
----------------	--

10. Danksagung

Herrn Professor Dr. med. R.G. Bretzel, Direktor der Medizinischen Klinik III und Poliklinik des Medizinischen Zentrums für Innere Medizin der Justus-Liebig-Universität Giessen, danke ich für die Überlassung des interessanten Themas sowie für die wertvollen Anregungen bei der Verwirklichung der Arbeit.

Mein ganz besonderer Dank gilt Dr. D. Brandhorst, der mir zu jedem Zeitpunkt dieser Arbeit hilfreich zur Seite gestanden hat und auch in schwierigen Phasen immer den Überblick behalten hat.

Des Weiteren möchte ich allen Mitarbeitern der Laboratorien der Medizinischen Klinik III danken, die alle einen wesentlichen Anteil an der vorliegenden Arbeit haben.

Meinen Eltern danke ich für die jetzt 29jährige Unterstützung in allen Lebenslagen. Ohne euch wäre ich nicht hier.